

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität in
Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

Rolle von T-Zellen bei COPD: Einfluss von Zigarettenrauch-Komponenten auf Differenzierungsprozesse von Th-Subpopulationen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanbiologie/Medizinwissenschaft
Doctor rerum medicinarum (Dr. rer. med.)



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nadja Baumgartl
aus Offenbach

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 09.06.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Herr PD Dr. Holger Garn
1. Korreferent:	Frau Prof. Dr. Magda Huber

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge
sind, wie sie sind.

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	4
1.2	Pathogenese der Zigarettenrauch-induzierten COPD.....	12
1.3	Relevanz von autoimmunen Prozessen in der COPD.....	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Puffer und Medien	31
2.2	in vitro.....	33
2.2.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	33
2.2.2	Protokolle	33
2.2.2.1	Protokoll <i>in vitro</i> I: Einfluss von CSE-Medium auf naive Zellen	33
2.2.2.2	Protokoll <i>in vitro</i> II: Einfluss von CSE-Medium auf die Entwicklung von Th-Subtypen	34
2.2.2.3	Protokoll <i>in vitro</i> III: Einfluss von CSE-Medium auf bereits differenzierte Th-Subtypen	35
2.2.3	Methoden	36
2.2.3.1	Isolierung von Splenozyten aus der Maus für <i>in vitro</i> Versuche	36
2.2.3.2	Separation von CD4+ und CD4+CD62L+ Zellen.....	37
2.2.3.3	Stimulierung und Polarisierung der Zellen.....	40
2.2.3.4	Transfer und Restimulation.....	42
2.2.3.5	Proliferationstest.....	42
2.2.3.6	Zellzählung	43
2.3	in vivo.....	44
2.3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	44
2.3.2	Protokoll: Einfluss von Zigarettenrauch auf die Differenzierung der verschiedenen Th-Subtypen	44
2.3.3	Methoden	45
2.3.3.1	Gewinnung des mit Zigarettenrauch versetztem (CSE) Medium	45
2.3.3.2	Probengewinnung aus Versuchstieren	46
2.3.3.2.1	Invasive Messung der Lungenfunktion	46
2.3.3.2.1.1	Bestimmung des Atemwegwiderstands (R) und der Lungencompliance (C)	46
2.3.3.2.2	Serumproben	47
2.3.3.2.3	Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	47
2.3.3.2.4	Perfundieren der Lunge	47
2.3.3.2.5	Weitere Organpräparationen.....	48
2.3.3.3	Probenweiterverarbeitung	48
2.3.3.3.1	Differenzierung von Leukozytenpopulationen der BAL	48
2.3.3.3.2	Lungenhistologie	49
2.3.3.3.3	Gewinnung primärer Zellen aus verschiedenen Organen	49
2.4	analytische Methoden	51
2.4.1	Proteinbiochemie	51
2.4.1.1	Färbungen für Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	51
2.4.1.1.1	Oberflächenfärbung.....	51
2.4.1.1.2	Intrazelluläre Färbung (ICS).....	52
2.4.1.1.3	Lebend-Tot-Färbung.....	54
2.4.1.2	Durchflusszytometrie	54
2.4.1.2.1	FACS	54
2.4.1.2.2	FACS Cell Sorting.....	55
2.4.1.3	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen.....	55

2.4.1.3.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	55
2.4.1.3.2	Cytometric Bead Array (CBA)	57
2.4.1.4	Proteinnachweis mittels Western Blot	58
2.4.1.4.1	Protein- Isolierung.....	58
2.4.1.4.2	Protein- Fällung und Konzentrationsbestimmung mittels BCA	58
2.4.1.4.3	Western Blot	58
2.4.1.4.4	Strippen von PVDF- Membranen	59
2.4.2	Molekularbiologische Methoden	59
2.4.2.1	RNA-Aufreinigung	59
2.4.2.2	DNA Verdau	60
2.4.2.3	cDNA Synthese aus aufgereinigter mRNA.....	60
2.4.2.4	Quantitative real time PCR	61
2.5	Statistische Analyse.....	62
3	<i>Ergebnisse.....</i>	63
3.1	Ergebnisse der in vitro Untersuchungen	63
3.1.1	Einfluss von CSE-Medium auf Vitalität und Proliferation primärer muriner CD4+ Zellen 63	
3.1.2	Untersuchungen zur potentiellen Induktion einer T-Zelldifferenzierung durch CSE- Medium 67	
3.1.3	Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von hoch aufgereinigten naiven CD4+ Zellen	75
3.1.4	Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von Th1/ Th2/ Th9/ Th17 und Tregs	78
3.1.5	Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf bereits differenzierte CD4+ Zellen (Th1/ Th2/ Th17 und Tregs)	114
3.2	Ergebnisse der in vivo Untersuchungen	116
3.2.1	Einfluss chronischer Rauchexposition auf den Lungen-Phänotyp anhand eines Mausmodells.....	116
3.2.2	Einfluss chronischer Rauchexposition auf verschiedene Th-Subgruppen	119
4	<i>Diskussion.....</i>	124
5	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	141
6	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	163
7	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</i>	166
8	<i>Zusammenfassung.....</i>	170
9	<i>Anhang.....</i>	173
10	<i>Publikationen und Kongressbeiträge.....</i>	185
11	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</i>	187
12	<i>Danksagung.....</i>	188

1 Einleitung

1.1 *Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD)*

Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease* - COPD) hat kein eigenständiges Erkrankungsbild, sie beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen, zu denen die chronische Bronchitis mit Obstruktion der Lunge und das Lungenemphysem gehören. Laut *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) ist COPD eine allgemein vermeidbare und behandelbare Krankheit; charakterisiert durch persistierende Atemwegsverengungen, die für gewöhnlich progressiv verlaufen und mit einer abnormen chronischen Inflammation der Atemwege infolge Exposition schädlichen Partikeln und Gasen assoziiert ist. Exazerbationen und Komorbiditäten tragen zum individuellen Gesamtschweregrad der COPD jedes Patienten bei (Vestbo et al. 2013). Basierend auf dem jeweils neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisstand zur Erkrankung wurde die Definition der COPD öfter aktualisiert. Dabei wurde die Annahme, dass die Limitation des Atemflusses in der COPD irreversibel ist, revidiert, da COPD-Patienten durch die Therapie mit Bronchodilatoren eine signifikante Reversibilität zeigten. Der Atemfluss normalisiert sich aber niemals auf das ursprünglich normale Maß und somit wurde die Atemwegsverengung als persistierend definiert. Außerdem zeigen neue Beobachtungen, dass die chronische Inflammation der Atemwege und des Lungenparenchyms keine spezifischen abnormalen Charakteristika aufweist. Stattdessen scheint in COPD-Patienten die Inflammation nicht abzuklingen, sondern zu persistieren (Vestbo 2014). Die Inflammation befindet sich prädominant in den kleinen Atemwegen (*Small Airway Disease*) und im Lungenparenchym, obwohl auch ähnliche entzündliche Veränderungen in den zentralen Atemwegen (*Chronic Bronchitis*) gefunden werden (Barnes 2000).

Ein Emphysem ist charakterisiert durch irreversible Schäden des Parenchyms und im Besonderen durch die Destruktion der Elastin-Fasern und Komponenten der extrazellulären Matrix durch unkontrollierte Proteolyse. Dieser Prozess entsteht durch ein Ungleichgewicht von verschiedenen Proteinasen,

neutrophiler Elastase und Matrixmetalloproteinasen (MMP's) und deren endogenen Inhibitoren, alpha-1 Antitrypsin und *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs) (Owen 2008). Die neutrophile Elastase ist außerdem via Stimulation der Goblet-Zellen in den großen Atemwegen an einer massiven Schleimproduktion (*Mucus Hypersecretion*) beteiligt, welche zusammen mit der persistierenden Inflammation die Hauptkriterien der chronischen Bronchitis darstellen (Nadel und Burgel 2001). Die *Small airways disease* ist definiert durch unkontrollierte Inflammation kombiniert mit einer Fibrose der Atemwegswände. Außerdem ist die Erkrankung assoziiert mit infiltrierenden inflammatorischen Zellen und deren Mediatoren (Lams et al. 1998; Hogg et al. 2004; Hogg 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die chronische Bronchitis, eine Emphysembildung und die *Small airways disease* die drei Hauptfaktoren der COPD-assoziierten Symptome sind (Holloway und Donnelly 2013).

Zu den Hauptsymptomen der COPD gehört als erstes ein immer wiederkehrender Husten, der von Auswurf (Sputum) begleitet sein kann. Mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung kommt es unter Belastung zu Atemnot (Dyspnoe) und bei schwerwiegender COPD weisen die Patienten vermehrten Husten mit meist eitrigem Sputum, schwere Dyspnoe mit röchelnder Atmung, starke Einschränkung der Bewegungsfreiheit und Entwicklung eines Lungenemphysems auf. Des Weiteren kommt es zu Nebensymptomen wie Fieber, Anorexie mit Gewichtsverlust (BMI < 21), pulmonale Hypertonie und Herzinsuffizienz (Cor pulmonale) (Aktuelle Pharmakologie in Lehre und Forschung, März 2005 www.kojda.de).

Stadium	Charakteristika
0: Risiko für COPD	Normale Spirometrie Chronische Symptome (Husten, Sputum Produktion), familiäre COPD, vermehrt Risikofaktoren ausgesetzt, Dyspnoe
GOLD 1: Milde COPD	$FEV_1/FVC < 0,7$; $FEV_1 \geq 80 \%$ prognostiziert
GOLD 2: Moderate COPD	$FEV_1/FVC < 0,7$; $50 \% \leq FEV_1 < 80 \%$ prognostiziert
GOLD 3: Schwere COPD	$FEV_1/FVC < 0,7$; $30 \% \leq FEV_1 < 50 \%$ prognostiziert
GOLD 4: Sehr schwere COPD	$FEV_1/FVC < 0,7$; $FEV_1 < 30 \%$ prognostiziert

Tab.1: Einstufung des Schweregrades der COPD (gemäß GOLD 2014)

Der Schweregrad der COPD wird gemäß GOLD in 4 Stufen eingeteilt (siehe Tab.1). Hierbei ist die spirometrisch ermittelte Ausprägung der Lungenfunktionsstörung der entscheidende Parameter für die Einteilung. Diese wird anhand des in der ersten Sekunde erzielbaren maximalen Ausatemungsvolumens (*forced expiratory volume per second*, FEV₁) bestimmt. Außerdem ist bei Auftreten der oben aufgeführten Hauptsymptome bei Individuen über einem Alter von 40 ein vermehrtes Risiko für die Wahrscheinlichkeit, an einer COPD zu erkranken, gegeben. Um eine endgültige Diagnose treffen zu können, muss jedoch immer die Spirometrie herangezogen werden.

Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

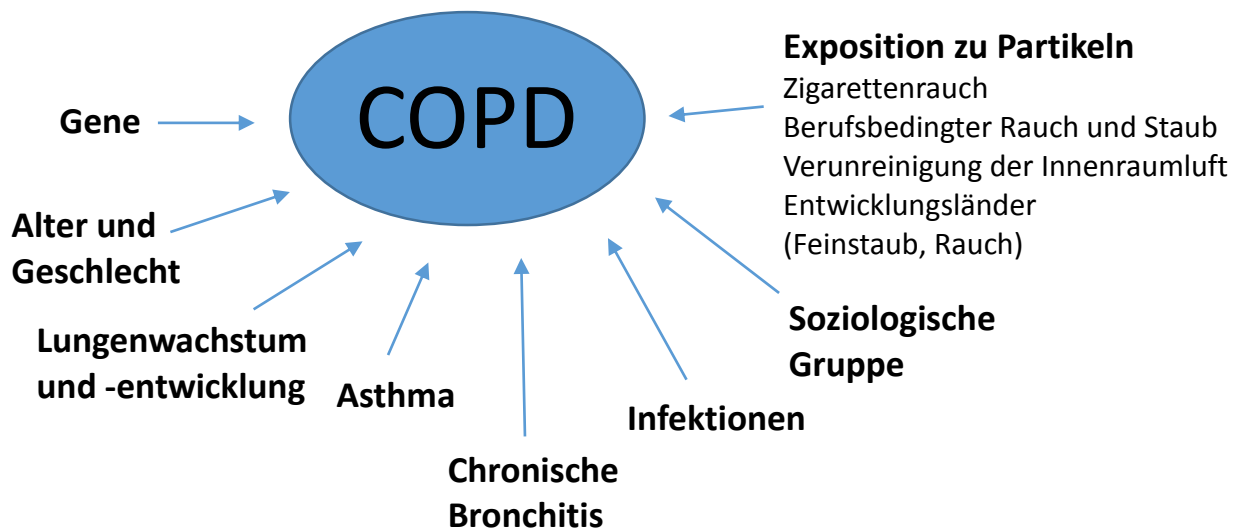
Die COPD ist eine schwerwiegende und global auftretende Erkrankung, die besonders in den Entwicklungsländern durch verstärkte Innenraum Luftverschmutzung auftritt (Barnes 2007). Die Erkrankung ist weltweit die fünfthäufigste Todesursache und lag 2002 in Deutschland an 7. Stelle der

Todesursachen (statistisches Bundesamt). Für die nächsten Jahre ist ein weiterer Anstieg der Prävalenz, Morbidität und Mortalität zu erwarten, so dass die COPD bis 2030 weltweit auf den vierten Platz der Todesursachen vorrücken wird (Mathers und Loncar 2006). Zur Prävalenz der COPD in Deutschland liegen keine validen Angaben vor. In Deutschland wird die Prävalenz der chronischen Bronchitis bei der erwachsenen Bevölkerung auf 10 bis 15 % geschätzt, wobei der genaue Anteil derer mit chronisch obstruktiver Bronchitis (Husten, Sputum und Dyspnoe) an der Gesamtprävalenz nicht bekannt ist (Nationale VersorgungsLeitlinie COPD). Durch den stetigen Anstieg der Prävalenzrate für COPD in den letzten Jahren, haben die Krankenkassen mit explosionsartig zunehmenden Gesundheitskosten zu kämpfen.

Die weltweite Prävalenz wird auf 25 % geschätzt und betrifft neuerdings auf Grund der Angleichung des Rauchverhaltens von Frauen an das der Männer gleichermaßen Männer wie Frauen (Gershon et al. 2011). COPD stellt laut der European Respiratory Society (ERS) eine signifikante wirtschaftliche Belastung dar. In der Europäischen Union werden geschätzte 6 % des gesamten Gesundheitsbudgets für Atemwegserkrankungen ausgeben, wobei 56 % (38,6 Milliarden Euro) davon die COPD beansprucht (European Lung White Book: Huddersfield, European Respiratory Society Journals, Ltd; 2003). Im globalen Markt wurden für COPD ungefähr US\$ 5,2 Milliarden ausgegeben und bis 2017 ist ein Betrag von US\$ 5,6 Milliarden vorhergesagt, was eine jährliche Wachstumsrate von ~ 6 % bedeutet (Barnes 2013).

Risikofaktoren

Der derzeitige Wissensstand der zu COPD führenden Risikofaktoren in vielerlei Hinsicht noch unvollständig. Zigarettenrauch ist mit Abstand der häufigste Risikofaktor für COPD, ist er nicht der Einzige (siehe Abb.1). Es gibt eindeutige Anzeichen aus epidemiologischen Studien, dass auch Nichtraucher chronisch Atemwegsverengungen entwickeln können (Behrendt 2005; Celli et al. 2005; Eisner et al. 2010).



**Abb.1: Faktoren, die Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf einer COPD haben
(Gemäß GOLD 2014)**

Gene

Der am besten dokumentierte genetische Risikofaktor für COPD ist der angeborene Mangel an alpha-1 Antitrypsin, einem zirkulierenden Hauptinhibitor von Serin Proteasen (z.B: Neutrophilen-Elastase). Der alpha-1 Antitrypsin Mangel betrifft mit etwa 1-9 % der COPD Patienten (Lieberman et al. 1986) nur einen kleinen Teil der Weltbevölkerung (1:2000 – 1:5000), stellt aber zusammen mit umweltbedingten Expositionen die beiden Hauptrisikofaktoren der COPD dar (Stoller und Aboussouan 2005).

Ein signifikantes familiäres Risiko für Atemwegsverengungen in Folge einer schweren COPD, wurde für rauchende Geschwisterpaare gesehen (McCloskey et al. 2001).

Einzelne Gene, wie z.B. Matrix-Metalloproteinase 12 (MMP12), werden mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion in Verbindung gebracht (Hunninghake et al. 2009). Es gibt viele genomumfassende Studien, aber die meisten COPD Gen-Kandidaten Studien sind statistisch nicht aussagekräftig genug (Power zu gering), um genetische Effekte zu detektieren. Quantitative Meta-Analysen identifizierten Änderungen in nur vier Genen (GSTM₁, TGFB₁, TNF und SOD₃) mit statistisch signifikanten Anzeichen für eine Assoziation mit einer COPD Prädisposition (Castaldi et al. 2010).

Exposition von Partikeln

Weltweit ist Zigarettenrauch der größte Risikofaktor, um eine COPD zu entwickeln. Raucher haben eine größere Prävalenz für respiratorische Symptome und abnormale Lungenfunktionen, sowie einen größeren Abfall in der spirometrischen Messung (FEV₁) und eine höhere Sterblichkeitsrate durch COPD als Nichtraucher (Kohansal et al. 2009). Das Rauchen anderer Arten von Tabak (z.B. Pfeife, Zigarre, Wasserpfeife Raad et al. 2011) sowie von Marijuana (Tan et al. 2009) ist ebenfalls ein Risikofaktor für COPD (WHO Studie 2005). Passives Rauchen kann auch zu respiratorischen Symptomen und COPD führen (Eisner et al. 2005; Salvi 2014). Auch das Rauchen während der Schwangerschaft stellt ein Risiko für den Fetus dar, indem das Lungenwachstum und die Lungenentwicklung sowie möglicherweise das Immunsystem beeinflusst wird (Holt 1987; Tager et al. 1995).

Die Faktoren, die den gefährdeten vom nicht gefährdeten Raucher unterscheiden, sind noch nicht definiert.

Berufsbedingte Exposition mit organischem und anorganischem Staub, chemischen Reagenzien und Rauch sind unterschätzte Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD (10 – 20 %) (Trupin et al. 2003; Matheson et al. 2005; Hnizdo et al. 2004; Balmes et al. 2003).

Die Nutzung von Holz (zum Heizen), Dünger, Kompost, Holzkohle und Heizöl führen zu einer sehr hohen Luftverunreinigung. Außerdem verstärkt sich die Annahme, dass zusätzlich eine erhöhte Innenraumluftbelastung durch Kochen mit Gas und Heizen in kleinen nicht gut belüfteten Räumen zu einem Risikofaktor für eine COPD wird (Sezer et al. 2006; Orozco-Levi et al. 2006; Ezzati und Kammen 2001).

Weitere Faktoren

Eine Reihe weiterer Faktoren werden als Risikofaktoren für die COPD angesehen. Dazu wird auch das Alter gezählt, wobei es unklar ist, ob das Alter an sich zu einem erhöhten Risiko für COPD führt oder ob es die Summe der kumulativen Expositionen während des Lebens widerspiegelt. Früher gab es geschlechtsspezifische Unterschiede für das Risiko, an COPD zu erkranken mit einem erhöhten Risiko für Männer. Neuerdings ist das Risiko für beide Geschlechter annähernd gleich, da sich das Rauchverhalten der Frauen an das

der Männer angeglichen hat (Papaioannou et al. 2014). Einige Studien zeigten sogar, dass Frauen stärker auf Tabakrauch reagieren als Männer (Foreman et al. 2011; Sorheim et al. 2010).

Nicht nur Alter und Geschlecht sind Risikofaktoren, einigen Aussagen nach ist das Risiko für COPD invers mit dem soziologischem Status verbunden (Prescott und Vestbo 1999; Gershon et al. 2014; Gershon et al. 2012).

Des weiteren können möglicher Weise mehrere Lungenerkrankungen wie Asthma, bronchiale Hyperreaktivität und chronische Bronchitis (Fabbri und Hurd 2003; Tashkin et al. 1996; Vestbo et al. 1996; Barker et al. 1991; Svanes et al. 2009) eine COPD begünstigen und virale und bakterielle Infektionen zur Pathogenese und Progression einer COPD beitragen, da sie hauptverantwortlich für akute Exazerbationen sind (Seemungal et al. 2001; Sethi et al. 2006).

Therapieansätze

Es besteht ein vermehrtes Interesse, die der Erkrankung zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen (Barnes et al. 2003) zu erforschen, um so neue Therapieansätze zur Bekämpfung der chronischen Inflammation und den damit verbundenen Exazerbationen bei einer COPD zu finden (Barnes 2001). Als präventive Maßnahme ist das Vermeiden von Zigarettenrauch (aktiv und passiv) an erster Stelle zu nennen. Daher wurden in den letzten Jahren die Raucherbereiche immer mehr eingeschränkt bzw. eingegrenzt. Zudem versucht die Regierung mit Warnungen auf den Zigarettenschachteln auf die Auswirkungen des Rauchens aufmerksam zu machen.

Derzeitige Therapieansätze in der COPD sind relativ ineffektiv, da es keine Medikamente gibt, welche die Progression oder Mortalität der Erkrankung vermindern oder einen direkten Effekt auf die Exazerbationen haben, die im Wesentlichen für die Hospitalisierung der COPD Patienten verantwortlich sind (Barnes 2013). Als Standardtherapie werden langwirksame Bronchodilatoren verwendet, wie die *long-acting β_2 -adrenergic receptor agonists* (LABAs) und *long-acting muscarinic acetylcholine receptor antagonists* (LAMAs) oder die Kombination aus beiden (LABA-LAMA) (Kew et al. 2014; Matera et al. 2011). Obwohl diese Medikamente zu einer effektiven Bronchodilatation führen, haben sie keinen Einfluss auf die zirkulierenden Mediatoren der chronischen

Inflammation. Inhalative Kortikosteroide, die in Asthma-Patienten zur Behandlung der Atemwegsentzündungen erfolgreich eingesetzt werden, sind in COPD-Patienten ineffektiv als anti-inflammatorische Therapie (Barnes 2010). Ganz neue Ansätze für die Bronchospamolyse stellen sogenannte dimere Moleküle dar. Diese Substanzen wirken gleichzeitig an den muscarinischen Rezeptoren antagonistisch und an den β -Rezeptoren agonistisch (MABA) (Cazzola et al. 2013). Diese Verbindung hat in einer Phase-2b Studie eine gute Wirksamkeit mit guter Verträglichkeit gezeigt (Hughes et al. 2015). Daher sind diese dimeren Moleküle als neuer Therapieansatz viel versprechend. Bei der Entwicklung von antientzündlichen Therapiestrategien konzentriert sich die pharmakologische Forschung direkt auf die immunologischen Signalwege. Als Beispiel sind hier die Phosphodiesterase-Inhibitoren zu nennen. Allerdings konnten oral verabreichte PDE4-Inhibitoren in der klinischen Studie durch mangelnden Nachweis der Wirksamkeit nicht bestehen (Watz et al. 2013). Außerdem werden noch CXCR2-Antagonisten, Nuklear-Faktor-(NF)- κ B-Inhibitoren und p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Inhibitoren in klinischen Studien getestet (Rennrad et al. 2015; Betts et al. 2015; Sriskantharajah et al. 2013). Da es zurzeit keine effektive Therapie für die Behandlung von COPD gibt, ist die weitere Entwicklung von neuen anti-inflammatorischen Therapeutika unabdingbar (Barnes 2013; Calverley et al. 2009).

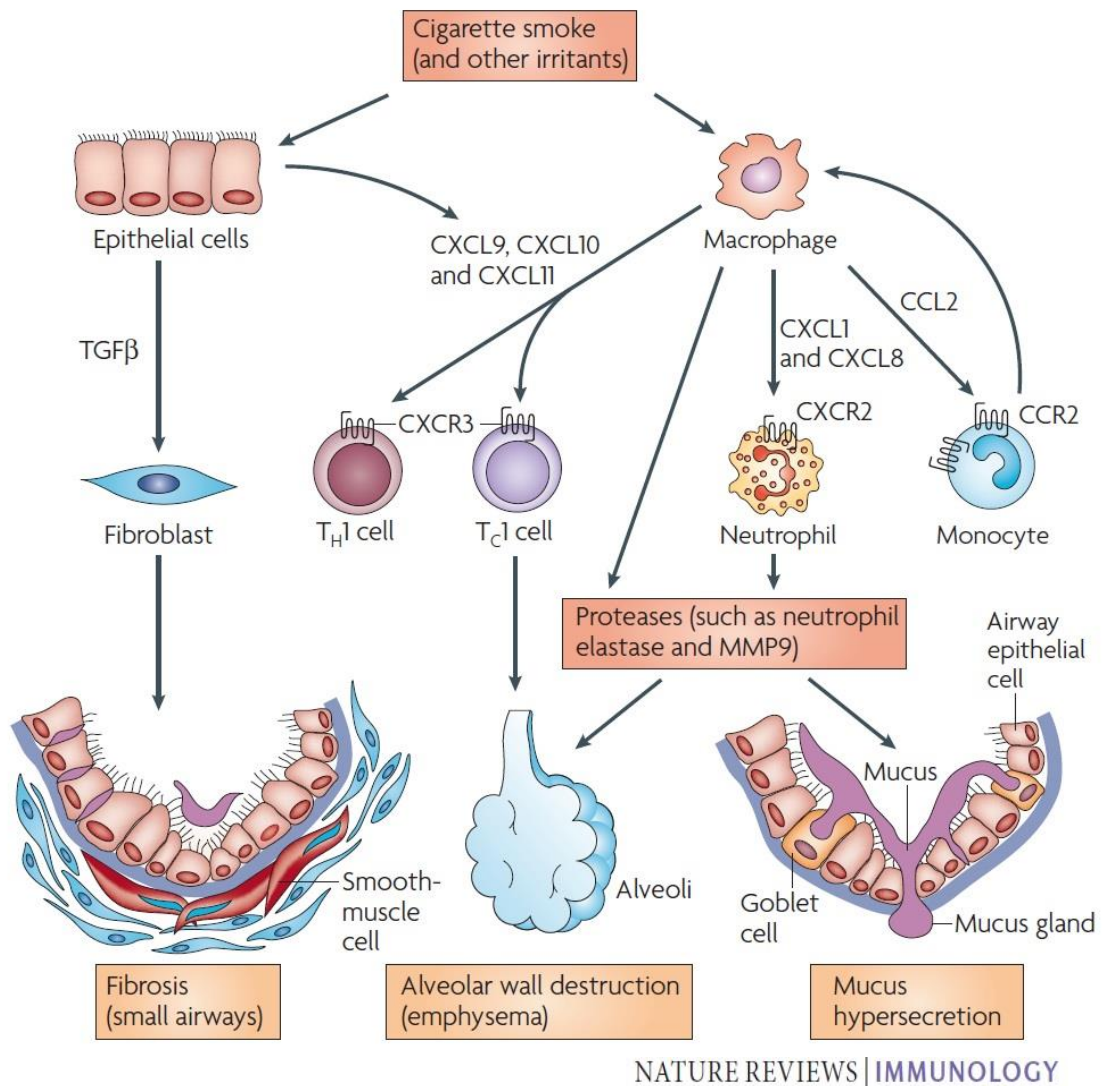
Die pharmakologische Therapie muss auf jeden einzelnen COPD Patienten individuell angepasst werden, da der Schweregrad der Symptome und der verminderten Atemkapazität von vielen Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören unter anderem Frequenz und Schweregrad der Exazerbationen, respiratorische Defekte, Komorbiditäten (Osteoporose, Kardiovaskuläre Erkrankungen etc.) und der generelle Gesundheitszustand des Patienten (GOLD 2014, *Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention*). Des Weiteren wird COPD Patienten als unterstützende Maßnahme empfohlen, sich viel an der frischen Luft aufzuhalten und zu bewegen, sich der jährlichen Gripeschutzimpfung zu unterziehen und gezielte Antibiotika einzunehmen. Außerdem gibt es noch einige Behandlungen, um die Symptome von COPD Patienten zu verbessern. Darunter zählen Lungen-Rehabilitations-Programme, Oxygen-Therapie, ventilatorische Unterstützungen und chirurgische Eingriffe. Im Endstadium der Erkrankung wird eine Unterbringung in Palliativstationen

oder Sterbekliniken empfohlen (GOLD 2014, *Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention*).

1.2 Pathogenese der Zigarettenrauch-induzierten COPD

COPD ist assoziiert mit einer erhöhten inflammatorischen Antwort auf externe Stimuli, wie Zigarettenrauch (siehe Abb.2). Zigarettenrauch, als Hauptursache der COPD, enthält tausende gesundheits-gefährdende Bestandteile (Pfeifer et al. 2002). Neben der Belastung mit Nikotin, Schwermetallen und Karzinogenen führt Rauchen zu einer signifikanten Exposition mit Oxidantien. Dazu zählen organische freie Radikale, wie z.B.: Alkyl-, Alkyl- und Peroxyl-, sowie Aldehyd- und Superoxid-Radikale wie N_2O und NO (Eiserich et al. 1995).

Die durch Zigarettenrauch induzierten Entzündungen betreffen alle Bereiche des respiratorischen Systems. Dazu zählen die zentralen Atemwege, die kleinen Atemwege und das Lungenparenchym (Barnes et al. 2003). Die COPD umfasst drei pathophysiologische Hauptmerkmale: Emphysem-Bildung, chronische Bronchitis und Fibrose der kleinen Atemwege. Ein Emphysem beschreibt einen irreversiblen Schaden des Lungenparenchyms und im Besonderen der Elastin Fasern und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix, via unkontrollierter Proteolyse. Dieser Prozess ist, wie schon in der Definition der COPD erwähnt, durch ein Ungleichgewicht der Proteinasen, wie neutrophile Elastase und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren endogenen Inhibitoren wie alpha-1 antitrypsin oder tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) vermittelt (Owen 2008). Die neutrophile Elastase führt außerdem zur Mukus Hypersekretion (Fahy et al. 1992), indem sie die Goblet Zellen (schleimproduzierende Becherzellen) in den großen Atemwegen stimuliert. Diese Mukus Hypersekretion ist zusammen mit der persistierenden Entzündung das Hauptmerkmal für die chronische Bronchitis. Die Erkrankung der kleinen Atemwege ist charakterisiert durch unkontrollierte Entzündungen und Fibrose des Atemwegsepithels, was zusammen zur Funktionsunfähigkeit führt und zusätzlich mit einer erhöhten Anzahl an inflammatorischen Zellen in der Lunge und erhöhten Spiegeln deren Mediatoren begleitet ist (Hogg 2004; Lams et al. 1998).



NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY

Abb.2: Entzündungsprozesse und beteiligte Immunzellen bei COPD. PJ Barnes Nature Reviews Immunology 8, 183-192 (2008)

Inflammatorische Prozesse

Obwohl die übermäßige Entzündungsreaktion als eines der Hauptmerkmale der COPD anerkannt ist, ist die Beteiligung des inflammatorischen Milieus in der Lunge an der Pathophysiologie und Progression einer COPD bis jetzt nur unvollständig verstanden.

An der chronischen Entzündung sind Zellen des angeboren und des adaptiven Immunsystems beteiligt, wobei hier besonders die Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zu nennen sind (Barnes et al. 2003).

Angeborene Immunantwort

Das angeborene Immunsystem der Lunge besteht aus fünf Hauptkomponenten: Atemwegsepithel, alveolare Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und die natürlichen Killerzellen. Durch Zigarettenrauch werden die Makrophagen und das Atemwegsepithel zur Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aktiviert (siehe Abb.2).

Makrophagen

Makrophagen sind professionelle Phagozyten, die zur Aufrechterhaltung der natürlichen Flora der Atemwege in der Lunge beitragen. Obwohl die Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen von COPD Patienten erhöht ist (Barnes 2004; Grashoff et al. 1997), können auf Grund der defizienten bakteriellen *Clearance* trotzdem persistierende Bakterienherde in der Lunge nachgewiesen werden (Donnelly und Barnes 2012). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Defizienz ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden, aber er scheint durch leichte Änderungen der Bakterien-erkennenden Oberflächenrezeptoren vermittelt zu sein (Taylor et al. 2010). Daher finden sich häufig in den unteren Atemwegen von COPD Patienten Ansiedlungen von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, welche zu einer Exazerbation der Erkrankung führen können (Sethi et al. 2006). In Makrophagen von COPD Patienten ist nicht nur die *Clearance* der Bakterien vermindert, diese Makrophagen zeigen auch eine mangelhafte Beseitigung der apoptotischen Zellen (Hodge et al. 2003), was zur Akkumulation von nekrotischem Material in der Lunge führt, wodurch die chronische Inflammation aufrechterhalten wird. Des Weiteren sezernieren Makrophagen Proteasen (siehe Abb.2) und unterstützen somit zusammen mit den neutrophilen Granulozyten die Fibrolyse.

Neutrophile Granulozyten

Neben den Makrophagen ist in den Atemwegen von COPD Patienten auch die Anzahl an neutrophilen Granulozyten erhöht. Diese werden schnellstmöglich zu den entzündeten Bereichen rekrutiert, wo sie aktiviert werden und dadurch ihre inflammatorischen Mediatoren (wie z.B. Chemokine; vor allem (C-X-C Motive) Ligand 8 (CXCL8), reaktive Oxygen Spezies und Proteasen) sezernieren (Stockley 2002). CXCL8 ist ein potentes Chemoattraktant zur Rekrutierung und

Aktivierung von Neutrophilen, das auch von Makrophagen gebildet wird. Durch die autokrine Wirkung von CXCL-8 wird die neutrophile Entzündung aufrechterhalten. Neutrophile Granulozyten sind im Gegensatz zu Makrophagen kurzlebige Zellen, die in Apoptose übergehen und normalerweise durch die Makrophagen beseitigt werden (Luo und Loison 2008). Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen ebenfalls proteolytische Enzyme frei, wie z.B. die neutrophile Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3 und MMPs, welches zu einem Ungleichgewicht der Proteinase/Antiproteinase führt und letztlich ein Übergewicht proteolytischer Prozesse hervorrufen kann (Paone et al. 2011) (siehe Abb.2). Die neutrophile Elastase degradiert viele Komponenten der extrazellulären Matrix, vor allem Elastin (Lucey et al. 1998). Degradiertes Elastin wird über den Urin ausgeschieden, so dass erhöhte Mengen von Elastinfragmenten im Urin mit dem Schweregrad einer COPD korreliert werden konnten (Gottlieb et al. 1996). Die neutrophile Elastase führt nicht nur zur Proteolyse in der Lunge, sondern kann auch durch Spaltung der Pro-Peptide MMPs aktivieren. MMP-9 ist ein wichtiger Faktor bei der proteolytischen Destruktion in der Lunge und ist neben der neutrophilen Elastase in den Lungen von COPD Patienten vermehrt zu detektieren (Paone et al. 2011; Russell et al. 2002).

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind „professionelle“ antigen-präsentierende Zellen, welche eine Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellen. Durch die Integration vieler Signale aus der Umgebung unterstützen dendritische Zellen CD4+ Zell Differenzierung und CD8+ Zell Zytotoxizität (Lambrecht und Hammad 2010). Das Rauchen von Zigaretten wurde mit der Expansion einer Population von Langerhans` Zell-ähnlichen dendritischen Zellen auf epithelialen Oberflächen der unteren Atemwege in Verbindung gebracht. Nach einer akuten Rauchexposition werden dort schnellstmöglich selektiv myeloide dendritische Zellen rekrutiert, welche in der broncho alveolären Lavage (BAL) von Rauchern zu finden sind (Lommatzsch et al. 2010). Bei COPD Patienten zeigten einige Untergruppen der dendritischen Zellen im Lungenparenchym signifikant erhöhte Expressionen von co-stimulatorischen Molekülen, welche mit dem Schweregrad der COPD

korrelierten (Freeman et al. 2009; Vassallo et al. 2010). Bis jetzt ist die Rolle der dendritischen Zellen in der Pathogenese der COPD noch nicht genügend untersucht worden.

Adaptive Immunantwort

In COPD Patienten werden vermehrt aktivierte CD4+ und CD8+ Zellen detektiert (Saetta et al. 1999; Mikko et al. 2013; Roos-Engstrand et al. 2009). Dieser Anstieg an T-Lymphozyten erfolgt sowohl im Lungenparenchym als auch in den peripheren und zentralen Atemwegen. Durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems wird eine erhöhte Anzahl von T- und B-Lymphozyten induziert, welche in der Lunge lymphoide Follikel ausbilden können.

Lymphozyten

Die reife T-Zell Population lässt sich in zwei Hauptgruppen einteilen, welche sich in ihrer Funktion unterscheiden und sich über die Expression ihrer Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 charakterisieren lassen. CD4+ T-Zellen differenzieren zu Helferzellen (Th) oder regulatorische Zellen (Treg) und induzieren respektive inhibieren andere Immunzellen. Die CD8+ Zellen sind vor allem Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, welche ebenfalls in verschiedene Gruppen differenzieren können. Der Mechanismus der Differenzierung und Funktion der einzelnen T-Zell Subgruppen wurde in den letzten Jahren weitgehend entschlüsselt (Feuerer et al. 2009; Miossec et al. 2009; O'Garra und Arai 2000; Goswami und Kaplan 2011; Amsen et al. 2009; Zhu und Paul 2008). Nach der primären Aktivierung starten die CD8+ Zellen ihre Proliferation und Differenzierung zu einer zytotoxischen Effektorzelle. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontrolle der Inflammation, indem sie infizierte Zellen direkt durch die Ausschüttung von Perforin bzw. Granzymen per Apoptoseinduzierung töten können (Seder und Ahmed 2003). Naive CD4+ (Th0) Zellen können durch direkten Kontakt zu Antigenpräsentierenden Zellen, wie den dendritischen Zellen, stimuliert werden. Die T-Zellen produzieren dann zur klonalen Expansion das Zytokin IL-2. In Abhängigkeit des umgebenden Zytokin-Milieus können diese Th0 Zellen in verschiedene Th Subgruppen

differenzieren (Th1, Th2, Th9, Th17 und Treg), welche alle unterschiedliche immunmodulatorische Effektorfunktionen haben (Magombedze et al. 2013).

Die CD8⁺ Zellen (Tc1) setzen eine Vielzahl von Zytokinen frei und unterstützen vermutlich so die in COPD zu beobachtende Th1-typ Inflammation (Shirai et al. 2010). Dazu gehören vor allem die auch von den Th1 Zellen gebildeten Zytokine TNF- α und IFN- γ (Freeman et al. 2010) (siehe Abb.3). IFN- γ orchestriert die Infiltration von weiteren Th1 und Tc1 Zellen in die Lunge von COPD Patienten (Grumelli et al. 2004).

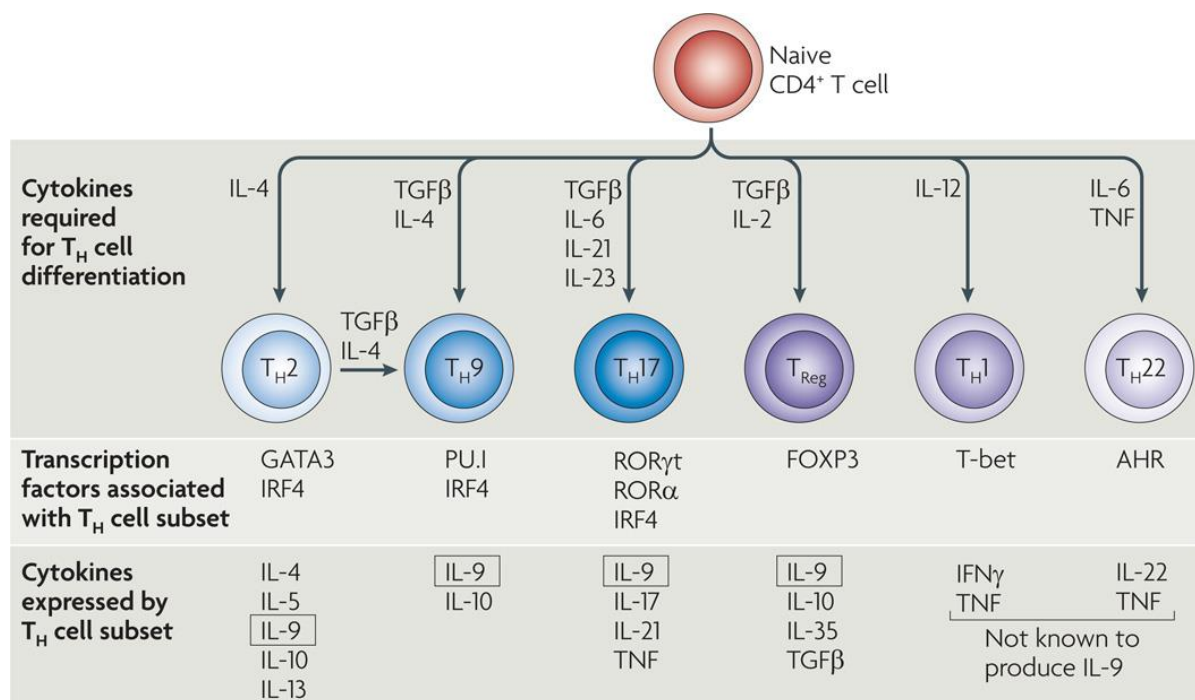


Abb.3 Differenzierung der einzelnen Th Subtypen, Noelle, Nat Rev Immunol 2010

Verschiedene Differenzierungs-Pathways der Effektor CD4⁺ T-Zellen mit ihren Transkriptionsfaktoren und den für ihre Entwicklung wichtigen Zytokinen, sowie einige Zytokine, die sie selbst produzieren. Interleukin (IL), T Helfer Zelle (TH), regulatorische T-Zelle (TReg), transforming growth factor- β (TGF β), aryl hydrocarbon receptor (AhR), forkhead box P3 (Foxp-3), GATA-binding protein 3 (GATA-3), interferon- γ (IFN- γ), interferon-regulatory factor 4 (IRF4), retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR), tumour necrosis factor (TNF), T-box transcription factor (T-bet)

Aber auch die Spiegel von Th2 Zytokinen sind in COPD Patienten verändert. So ist zum Beispiel eine erhöhte Expression von IL-4 in den CD8⁺ Zellen (Tc2) in der broncho alveolären Lavage (BAL) nachzuweisen (Kemeny et al. 1999; Barczyk et al. 2006). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Expression eines anderen Th2 Zytokins, des IL-13, in Patienten mit einer schweren COPD vermindert ist (Boutten et al. 2004).

Eine weitere Subgruppe der CD4⁺ Zellen, die eine bedeutende Rolle in Entzündungsreaktionen und autoimmunen Prozessen spielen, sind Th17 Zellen. Sie werden unter anderem über den Transkriptionsfaktor ROR γ t reguliert (Manel et al. 2008). Bis jetzt ist noch sehr wenig über die Rolle der Th17 Zellen in der Pathogenese der COPD bekannt, aber die Level an IL-17A, dem prädominantem Zytokin der Th17 Zellen (siehe Abb.3), sind im Sputum von COPD Patienten erhöht (Manel et al. 2008). Weiterhin wurden vermehrt Th17 Zellen in bronchialen Biopsien von COPD Patienten nachgewiesen (Di Stefano et al. 2009).

Die regulatorischen T-Zellen (Tregs) sind eine Untergruppe der CD4⁺ Zellen mit immunregulatorischen Funktionen, welche autoimmune Prozesse inhibieren und die gesteigerte Inflammation unterdrücken können. Die zwei deutlichsten Untergruppen sind die natürlichen Tregs und die induzierbaren oder adaptiven Tregs. Die natürlichen Tregs verlassen den Thymus als Effektorzelle und sind essentiell für die Bildung der Selbst-Toleranz, wogegen sich die induzierbaren Tregs in der Peripherie entwickeln und durch exogene Antigene aktiviert werden (Dasgupta und Saxena 2012). Tregs übertragen ihre suppressiven Effekte auf andere T-Zellen oder antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen über Kontakt-abhängige Mechanismen oder die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 und Transforming growth factor β (TGF- β) (Trzonkowski et al. 2004; Tang et al. 2008). Die Tregs sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp-3 charakterisiert (siehe Abb.3). Raucher mit COPD und Emphysem haben im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Raucher ohne COPD und gesunde Nichtraucher) signifikant weniger Tregs in den Lungen, was sich durch weniger messenger RNA (mRNA) für Foxp-3 und weniger IL-10 Sekretion zeigt (Wang et al. 2014; Lee et al. 2007). Allerdings gibt es kontroverse Aussagen zu dem Anteil an Tregs in der BAL von COPD Patienten. Zum einen wurden weniger und in ihrer Aktivität abgeschwächte Tregs in der BAL von COPD Patienten gefunden (Barcelo et al. 2008), zum anderen zeigte eine andere Gruppe signifikant mehr Foxp-3⁺ Zellen in der BAL (Smyth et al. 2007).

Über die Rolle der Th9 Zellen in der Pathogenese von COPD ist noch sehr wenig bekannt. Kürzlich wurden jedoch in Sputum-Proben von COPD Patienten signifikant erhöhte Level an dem Th9 assoziierten Hauptzytokin, IL-9,

beschrieben (Liu et al. 2004). Eine andere Gruppe konnte erhöhte mRNA Expressionen von IL-9 in Lungen-Biopsien von COPD Patienten zeigen (Panzner et al. 2003). Der Haupttranskriptionsfaktor der IL-9 produzierenden T-Zellen ist PU.1 (SPI1 Gen) (Chang et al. 2010). Kürzlich wurde noch ein weiterer Transkriptionsfaktor BATF (*B cell activating transcription factor-like*) als zentraler Regulator der Th9 Zellen beschrieben (Jabeen et al. 2013).

Die B-Zellen bilden die Grundlage der spezifischen humoralen Immunantwort. Der Anteil an B-Lymphozyten ist in den großen Atemwegen von COPD Patienten vermehrt. Außerdem treten vermehrte peribronchiale (in den kleinen Atemwegen) und periphere (im Lungenparenchym) B-Zellen in Form von lymphoiden Follikeln bei COPD Patienten auf, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Hogg 2004; van der Strate et al. 2006).

1.3 Relevanz von autoimmunen Prozessen in der COPD

Paradoxerweise entwickeln weder alle Raucher eine COPD noch kann das Einstellen des Rauchens die Entwicklung einer COPD nicht unterbinden. Daher ist die Rolle des adaptiven Immunsystems bei der Entwicklung der parenchymalen Zerstörung in der Lunge von Rauchern zurzeit ein starkes Forschungsfeld. Mehrere Faktoren sprechen für die Mitwirkung von autoimmunen Prozessen in der Pathogenese der COPD. Zum einen die Präsenz von B-Zell geprägten lymphoiden Follikeln bei COPD Patienten mit fortgeschrittenem Schweregrad und zum anderen die Detektion von diversen Autoantikörpern im Serum einer Untergruppe von COPD Patienten (Lee et al. 2007; Nunez et al. 2011; Greene et al. 2010). Zu diesen Autoantikörpern gehören unter anderem anti-Elastin Antikörper, diese anti-Elastin Autoimmunität konnte in Patienten mit Zigarettenrauch induziertem Emphysem nachgewiesen werden (Lee et al. 2007). Allerdings konnte eine andere Gruppe diese Autoantikörper nicht nachweisen (Rinaldi et al. 2012), so dass auch die Rolle der anti-Elastin Antikörper kontrovers diskutiert wird. Außerdem wurden in COPD Patienten erhöhte Titer von Anti-Nukleären-Antikörpern detektiert, die allerdings keinen Zusammenhang mit dem Rauchverhalten oder der Lungenfunktion zeigten (Wood et al. 2011). Autoimmun-getriebene

Erkrankungen sind charakterisiert durch erhöhte Expressionen von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und dem kürzlich beschriebenen Zytokin IL-17A (Palmer und Weaver 2010). Doch die pathologische Relevanz von autoimmunen Prozessen bei COPD ist letztlich noch nicht geklärt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da Zigarettenrauch der häufigste Risikofaktor für eine COPD darstellt und das adaptive Immunsystem in der Zusammensetzung der einzelnen Th Subgruppen in diesem Erkrankungsbild verändert zu sein scheint, leitet sich daraus die Hypothese für die vorliegende Dissertation ab.

Zigarettenrauch hat eine Wirkung auf die Differenzierung von murinen naïven CD4+ Zellen sowie verschiedenen Th Subtypen. Im Rahmen dieser Arbeit wird zudem evaluiert, ob diese Effekte durch Zigarettenrauch bei der Induktion oder Perpetuation der chronischen Inflammation in der COPD-Pathogenese eine Rolle spielen.

Diese Untersuchungen werden zunächst mit Zigarettenrauch versetztem (*cigarette smoke extract* (CSE)) Medium an murinen CD4+ Zellen aus der Milz *in vitro* durchgeführt. Zur Überprüfung der Translation der *in vitro* Ergebnisse auf das *in vivo* System werden C57BL/6J – Mäuse mittels etablierter Rauchexpositionsmodelle (Seimetz et al. 2011) (Justus-Liebig-Universität Gießen) für 2 und 5 Monate Zigarettenrauch ausgesetzt. Dieser Mausstamm zeigt sich als geeignet, da schon vermehrt gezeigt werden konnte, dass diese Tiere eine Prädisposition zur Entwicklung eines Zigarettenrauch-induzierten Emphysems aufweisen (Guerassimov et al. 2004; Yao et al. 2008).

Folgende Fragestellungen wurden konkret untersucht:

- Einfluss von CSE-Medium auf die Kultivierung von primären CD4+ Zellen
- Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von naïven CD4+ Zellen
- Auswirkung von CSE- Medium auf die Differenzierung von Th1/ Th2/ Th9/ Th17 und Tregs
- Auswirkung von CSE-Medium auf bereits differenzierte CD4+ Zellen (Th1/ Th2/ Th17 und Tregs)
- Untersuchung der *in vivo* Translation der *in vitro* Ergebnisse mittels Charakterisierung des Zigarettenrauch-induzierten Phänotyps

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tab.2: Versuchstiere

C57BL/6N TV Nr.:MR20/13 Nr. 50/2013	Charles River, Sulzfeld, D
--	----------------------------

Tab.3: Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe, D
<i>Albumin bovine Fraction V</i> (BSA)	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-mouse-CD3e	eBiosciences, San Diego, USA
Anti-mouse-CD28	Über Protein A gereinigter, monoklonaler AK 37.51, AG Lohoff Uni Marburg
anti-mouse-IL-4 für Zellkultur	Kulturüberstand des Hybridoms 11B11, AG Lohoff Uni Marburg
anti-mouse-IFN- γ	Über Protein G gereinigter, monoklonaler AK XMG1-2, AG Lohoff Uni Marburg
Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments	Roche, Mannheim, D
Anti-Flourescein isothiacyanate (FITC) Biotin	eBiosciences, San Diego, USA
Beads, nanomag-CLD	Micromod Partikeltechnik GmbH, D
(+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Biotinylierter Anti-Goat Antikörper	Vector, Burlingame, USA
BM Blue POD Substrat	Roche, Mannheim, D
Borsäure	Sigma, Taufkirchen, D
Borat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CASY® Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D

CellFix	BD, Heidelberg, D
CFSE	eBioscience, San Diego, USA
Coenzym A	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Complete Protease-Inhibitor Tablette	Roche, Mannheim, D
DAPI	BioLegend, San Diego, USA
Diff-Quick®-Lösung	Dade-Behring, Marburg, D
Dithiothreitol (DTT)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DMEM, high Glucose	Biochrom AG, Berlin, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Eosin G	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
FACS Clean	BD, Heidelberg, D
FACS Flow™	BD, Heidelberg, D
FACS Rinse	BD, Heidelberg, D
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Forschungszigaretten (3R4F)	Kentucky Tobacco Research and Development Center at the University of Kentucky, Lexington, KY
Hämatoxilin II nach Gill	Merck, Darmstadt, D
HEPES	Sigma, Taufkirchen, D
Ionomycin Calcium Salz	Sigma, Taufkirchen, D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Ketamin	Inresa, Freiburg, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Luzigenin (Bis(N- methylacridinium)citrat)	Sigma, Taufkirchen, D
Magensium-Carbonat-Hydroxid- Pentahydrat (MgCO ₃) ₄ *Mg(OH) ₂ *5H ₂ O	Sigma, Taufkirchen, D
Magnesiumchlorid-Lösung 1M MgCl ₂	Ambion, Austin, USA

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%ig, Infusion	Braun, Melsungen, D
Natriumchlorid-Lösung 5M NaCl	Ambion, Austin, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	PAA LaboratoriesGmbH, Cölbe, D
Nichtessentielle Aminosäuren	PAA LaboratoriesGmbH, Cölbe, D
PanColl Mouse	PAN Biotech, Aidenbach, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PAS-Färbekit	Merck, Darmstadt, D
PBS Dulbeccos (1x) ohne Ca. u. Mg.	PAA LaboratoriesGmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA LaboratoriesGmbH, Cölbe, D
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Taufkirchen, USA
Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, D
Polyethylenglycol 6000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
QuantiTect™SYBR®Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
recombinant murine IL-6	Peprtech Inc, Rocky Hill, USA
recombinant murine IL-12	Peprtech Inc, Rocky Hill, USA
recombinant murine IL-4	Peprtech Inc, Rocky Hill, USA
rh-IL-2 10 000 U/mL	Eurocetus/ Chiron Benelux, Amsterdam
rh-TGF-β1	eBiosciences, San Diego, USA
RNAse freies Wasser	Eppendorf, Hamburg, D
Rnase ERASE	MP Biomedical, Illkirch, F
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Health Care, Leverkusen, D
ROTI®Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Roticlear (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 (1x) ohne L-Glutamin	PAA LaboratoriesGmbH, Cölbe, D

Salzsäure HCl	Merck, Darmstadt, D
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure 95-97% (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Sodiumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
Streptavidin	Promega, D
Tricin	Sigma, Taufkirchen, D
Tris-HCl-Lösung 1M	Invitrogen, Karlsruhe, D
TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe
Tween®20	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D

Tab.4: FACS-Reagenzien

BioLegend, San Diego, USA

<u>FACS-Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>
APC-anti-mouse CD4	0,5 mg/mL
FC-Block TruStain fcX anti-mouse CD16/32	1 mg/mL
FITC-anti-mouse GR 1-1	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: APC Rat IgG2b	0,2 mg/mL
Isotypkontrolle: Alexa Fluor 488 Mouse IgG1	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: Alexa Fluor 647 Mouse IgG1	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: Alexa Fluor 647 Rat IgG2a	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: FITC Rat IgG2a	0,2 mg/mL
Isotypkontrolle: FITC Rat IgG2b	0,2 mg/mL
Isotypkontrolle: PE Rat IgG1	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: PE Rat IgG2a	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: PE Armenian Hamster IgG	0,5 mg/mL
Isotypkontrolle: PercP rat IgG2b	0,2 mg/mL

Isotypkontrolle: V450 Rat IgG2a	0,5 mg/mL
PE-anti-mouse CD3	0,5 mg/mL
PE-anti-mouse IFN γ	0,5 mg/mL
PE-anti-mouse IL-4	0,2 mg/mL
PE-anti-mouse IL-9	0,2 mg/mL
PercP-anti-mouse CD45	0,2 mg/mL

BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA

<u>FACS-Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>
Comp Beads anti mouse Ig	nicht angegeben, 1 Tropfen verwenden
Comp Beads negative control	nicht angegeben, 1 Tropfen verwenden
FITC- anti-mouse CD8a	0,5 mg/mL
FITC- anti-mouse B220	0,5 mg/mL
FITC-anti-mouse CD11b	0,5 mg/mL
FITC-anti-mouse CD11c	0,5 mg/mL
FITC-anti-mouse Ter119	0,5 mg/mL
FITC-anti-mouse CD49b	0,5 mg/mL
Mouse TNF Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-17A Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-10 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-13 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-21 Flex Set	Höchste Standard: 10000 pg/mL
Mouse IL-9 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-6 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-4 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IL-5 Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Mouse IFN- γ Flex Set	Höchste Standard: 2500 pg/mL
Pacific Blue anti-mouse CD4	0,5 mg/mL
PE-anti-mouse CD62L	0,2 mg/mL
PE-anti-mouse IL-17A	0,2 mg/mL
PE-anti-mouse SiglecF	0,5 mg/mL

eBiosciences, San Diego, USA

<u>FACS-Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>
FITC-anti-mouse IFN γ	0,5 mg/mL
FITC-anti-mouse IL-17A	0,5 mg/mL
Foxp3 Staining Buffer Set	4fach Stocklösung
PE-anti-mouse Foxp3	0,2 mg/mL

Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE

<u>FACS-Reagenz</u>	<u>Konzentration</u>
APC- anti-mouse F4/80	0,5 mg/mL

Tab.5: ELISA-Reagenzien

TGF β Duo Set	R&D Systems, Wiesbaden, D
IFN γ Duo Set	R&D Systems, Wiesbaden, D

Tab.6: Kits

HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Live/Dead Fixable Dead cell stain Kit	Life technologies, Karlsruhe, D

Tab.7: Primer

Hergestellt von Metabion, Martinsried, D

Primer	Sequenz	Temperatur
BATF	F 5` AAG AGC CGA CAG AGA CAG AC 3` R 5` TCC TCG GTG AGC TGT TTG AT 3`	60 °C
Foxp-3	F 5` ACT CGC ATG TTC GCC TAC TT 3` R 5` AGG GAT TGG AGC ACT TGT TG 3`	60 °C
GATA-3	F 5` GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA 3` R 5` CAT TAG CGT TCC TCC TCC AG 3`	60 °C
IFN γ	F 5` GCT TTG CAG CTC TTC CTC AT 3` R 5` GCA GGA TTT TCA TGT CAC CA 3`	58 °C

IL-9	F 5' CTT GCC TGT TTT CCA TCG GG 3' R 5' TCT GTC TTC ATG GTC GGC TT 3'	60 °C
IL-13	F 5' GGA GCT GAG CAA CAT CAC AC 3' R 5' GTG GGC TAC TTC GAT TTT GG 3'	60 °C
L32	F 5' GCA AGT TCC TGG TCC ACA AT 3' R 5' GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG 3'	60 °C
PU.1 (Sfpi-1)	F 5' ACC AAC GTC CAA TGC ATG AC 3' R 5' GCA TCT GTT CCA GCT CCA TG 3'	60 °C
ROR γ t	F 5' TGC AAG ACT CAT CGA CAA GG 3' R 5' AGG GGA TTC AAC ATC AGT GC 3'	60 °C
Tbet	F 5' AGG TGT CTG GGA AGC TGA GA 3' R 5' CCA CAT CCA CAA ACA TCC TG 3'	60 °C

Tab.8: Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten (steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
24-Well-Platten (steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
48-Well-Platten (steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten weiß, Opaque Plate	Costar, Cambridge, USA
96-Well-Platten schwarz, Opaque Plate	Costar, Cambridge, USA
96-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp Flachboden	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten (steril, Rundboden)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Braunüle	Sarstedt, München, D
Casy® Cups	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
Einmal-Handschuhe: NOBAGLOVELatex	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter, D
Eppendorf Research 10 Pipette	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Research 100 Pipette	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Research 1000 Pipette	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD, Heidelberg, D
Filter Tips 0,1-10 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D

Filter Tips 2-100 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filter Tips 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objekträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenpitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten 5 mL, 10 mL und 20 mL	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (2 mL)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (15 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (20 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Sterilfilter: Filtropur BT50 0,2 500mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellsiebe 100 µm	BD Falcon, Bedford, USA

Tab.9: Geräte

BD FACS Canto™ II	BD, Heidelberg, D
BD FACS accuri	BD, Heidelberg, D
Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank	Heraeus, Osterode, D
CASY®Model TT (Cell-Counter)	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Counter AC-8	Assistent, Sondheim, D
Eppihalter mit Magnet	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
FACS Sort	BD, Heidelberg, D
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Immuno™wash 12 Mikrotiterplatten-washer	Nunc, Wiesbaden, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Hamburg, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Nanodrop 2000c	Peqlab, Erlangen, D

Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim, D
Plattenschüttler DSG 304/M4	Heidolph, Schwabach, D
Rauchmaschine	TSE Systems, Bad Homburg, D
Rotator	LaBinto BV, Breda, NL
RotorGene™3000e	Corbett, Sydney, AUS
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Burgwedel, D
Thermocell Cooling & Heating Block	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Tischzentrifuge: BIOFUGE pico	Heraeus, Osterode
Ultraspec 3100pro UV/Visibel Spectrophotometer	Biochrom, Cambridge, UK
Vortexer: MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Frankfurt, D

Tab.10: Software

Auswertungssoftware Magellan	Tecan, Crailsheim, D
BD FACS Diva6	BD, Heidelberg, D
CellF Imaging	Olympus, Hamburg, D
CellQuestPro	BD, Heidelberg, D
FCAP Array	BD, Heidelberg, D
Fusion Software	BMG, Offenburg, D
GraphPad Prism®	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
RotorGene™Software	Corbett, Sydney, AUS

2.1.1 Puffer und Medien

Bead-Puffer:

PBS 0,1 % Polyethylenglykol (v/v) pH 7

BSS:

BSS Pulver für 10 L, 0,6 g Penicillin G, 1 g Streptomycin Sulfat, 14,25 g NaHCO_3 und 23,83 g HEPES in 9,7 L H_2O lösen und pH auf 7,2 einstellen. Dann auf 10 L auf-füllen, steril filtrieren und portionieren.

β -Mercaptoethanol (ME)

Stammlösung für Zellkultur:

35 μL 2-Mercaptoethanol in 50 mL PBS lösen (10 mM), steril filtriert

1% β -Mercaptoethanol in RLT Puffer für RNA Aufreinigung:

500 μL β -Mercaptoethanol in 50 mL RLT Puffer

ELISA-Coating Puffer:

4,2 g NaHCO_3 0,1 M auf 500 mL H_2O , pH 8,3

ELISA-Blockierungs und Verdünnungspuffer:

PBS, 1 % BSA (m/v)

ELISA-Waschpuffer:

PBS, 0,1 % Tween 20 (v/v)

Erythrozyten-Lyse-Puffer (Ammoniumchlorid Puffer):

4,15 g NH_4Cl + 0,5 g KHCO_3 + 0,018 g EDTA in 500 mL Aqua dest. lösen, steril filtrieren

FCS (inaktiviert):

Serum auftauen lassen, 40 min bei 56 °C inaktivieren, auf Raumtemperatur (RT)

Abkühlen lassen, steril filtrieren und portionieren

Lungenverdau-Medium:

Pro Tier bzw. Lunge 5 mL

Für 10 mL Medium: 10 mL Zellkulturmedium + 100 µL Na Pyruvat + 200 µL DNase + 200 µL C

MACS-Puffer:

PBS; 0,5 % BSA (m/v); 4 mL von 0,25 M EDTA für [2 mM EDTA]

PBS 1 %FCS (v/v)**PBS 0,5 % BSA (m/v)****Restimulations-Medium:**

Pro Well 1 mL, für 20 mL PMA [50 mg/mL], Ionomycin [750 ng/mL], BrefA [10 µg/mL]

20 mL Zellkulturmedium + 1 µL PMA [1 mg/mL] + 15 µL Ionomycin [1 mg/mL] + 20 µL BrefeldinA [10 mg/mL]

Saponinpuffer:

PBS, 0,3 % Saponin (m/v), 2 % FCS (v/v)

SDS 10% (m/v) in H₂O bidest**Zell-Fixierungspuffer:**

PBS, 2 % Formaldehyd (v/v)

Zellkultur Beschichtungspuffer:

TRIS 50 mM in H₂O bidest.; pH 9,5, steril filtriert

Zellkultur-Medium:

RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 1 % L-Glutamin (v/v), 1 x NEAA, 100 mg/mL Penicillin G, 60 mg/mL Streptomycin, 50 µM β-M

2.2 *in vitro*

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die *in vitro* Versuche wurden männliche C57Bl/6 Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in den Räumen der Philipps Universität Marburg in einem belüfteten Käfigsystem gehalten, die Raumtemperatur betrug 20 °C, es wurde ein künstlicher 12 h-Hell-Dunkelzyklus erzeugt.

2.2.2 Protokolle

2.2.2.1 Protokoll *in vitro* I: Einfluss von CSE-Medium auf naive Zellen

Für die Untersuchung von CSE-Medium auf die Differenzierung von naiven CD4⁺ Zellen wurden die naiven Zellen aus der Milz mittels FACS-Sort (für hoch aufgereinigte CD4 Zellen) und der CD4⁺ Aufreinigungsmethode (siehe Kapitel 2.2.4) gewonnen. Naïve T Zellen (CD4⁺CD62L⁺) wurden mit 1 % CSE-Medium bzw. 2 % CSE-Medium für 3 Tage mit α CD3/ α CD28 und IL-2 bei 37 °C kultiviert. Für die qPCR Analysen wurden die RNA Proben nach 48 h genommen und das Pellet mit 350 μ L β MCE bei - 80 °C für die weitere Verarbeitung gelagert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die eine Hälfte der Zellen aus dem Well wieder mit frischem Medium bzw. CSE versetztem Medium plus IL-2 aufgefüllt und für weitere 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Die andere Hälfte der Zellen wurde nach einer Zellzählung mit PMA/Ionomycin und BrefA für 4 h restimuliert und mittels Oberflächenmarker und intrazellulärer Färbung gepaart mit einer DAPI Färbung, für die Bestimmung der Anzahl von toten Zellen, im FACS analysiert. Dies wurde ebenfalls mit den Zellen nach 6 Tagen Inkubation durchgeführt (siehe Abb.4).

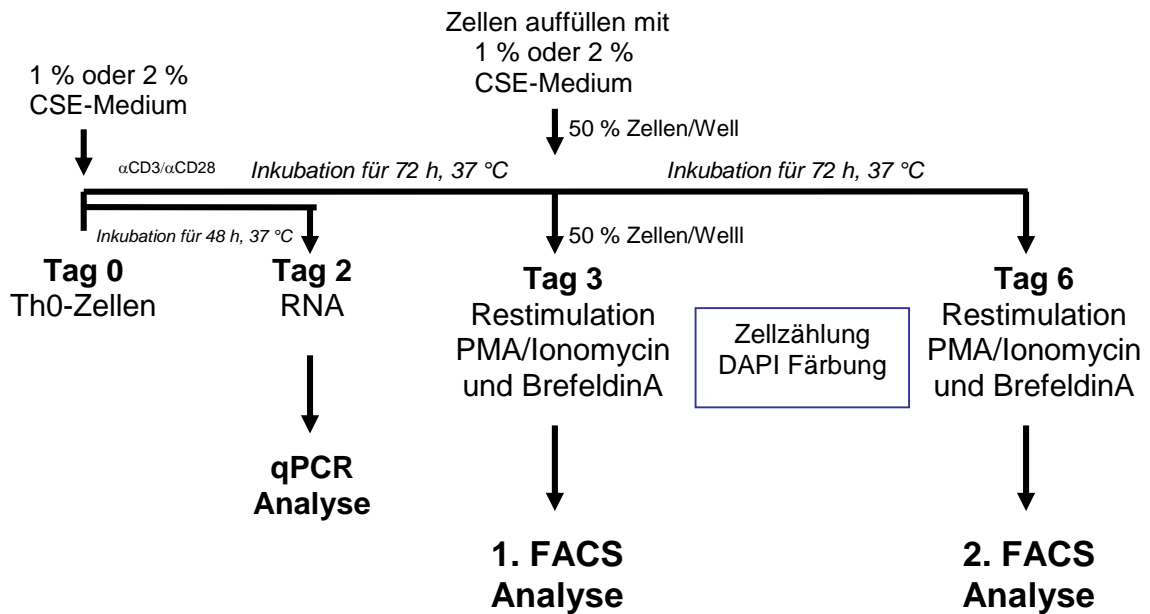


Abb.4: Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf naive Zellen

2.2.2.2 Protokoll *in vitro* II: Einfluss von CSE-Medium auf die Entwicklung von Th-Subtypen

Für die Untersuchung von CSE-Medium auf die induzierte Differenzierung von Th-Subtypen wurden naive Zellen aus der Milz mittels MACS und der CD4+ Aufreinigungsmethode (siehe Kapitel 2.2.4) gewonnen. Naïve T Zellen (CD4+CD62L+) wurden mit 1 % CSE-Medium bzw. 2 % CSE-Medium für 3 Tage mit α CD3/ α CD28 und der Subtyp-spezifischen Zytokin-Mischung (siehe Kapitel 2.2.8) bei 37 °C kultiviert. Für die qPCR Analysen wurden die RNA Proben nach 48 h genommen und das Pellet mit 350 μ L β MCE bei - 80 °C für die weitere Verarbeitung gelagert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die eine Hälfte der Zellen aus dem Well wieder mit frischem Medium bzw. CSE versetztem Medium plus IL-2 aufgefüllt und für weitere 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Die andere Hälfte der Zellen wurde nach einer Zellzählung mit PMA/Ionomycin und BrefA für 4 h restimuliert und mittels Oberflächenmarker und intrazellulärer Färbung gepaart mit einer DAPI Färbung, für die Bestimmung der Anzahl von toten Zellen, im FACS analysiert. Dies wurde ebenfalls mit den Zellen nach 6 Tagen Inkubation durchgeführt. Zusätzlich wurden hier die Zellen nach 3 Tagen Polarisation für 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde für CBA und ELISA Messungen abgenommen und die

Zellen mit 350 μ L β MCE versetzt und bei - 80 °C für weitere qPCR Analysen bzw. ohne β MCE für Western Blot gelagert (siehe Abb.5).

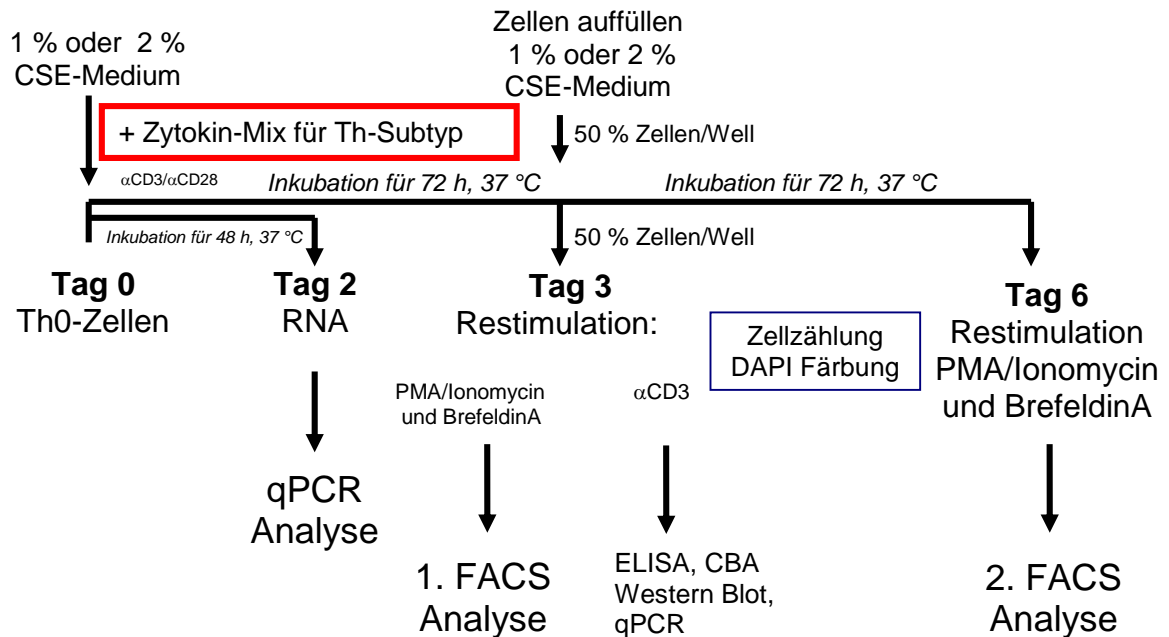


Abb.5: Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf die Entwicklung von Th-Subtypen

2.2.2.3 Protokoll *in vitro* III: Einfluss von CSE-Medium auf bereits differenzierte Th-Subtypen

Für die Untersuchung von CSE-Medium auf bereits differenzierte Th-Subtypen wurden naive Zellen aus der Milz mittels MACS und der CD4+ Aufreinigungsmethode (siehe Kapitel 2.2.4) gewonnen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C mit α CD3/ α CD28 und der Subtyp-spezifischen Zytokin-Mischung (siehe Kapitel 2.2.8) wurden die Zellen gezählt und zur Bestimmung der Anzahl an toten Zellen mit DAPI gefärbt. Die restliche Hälfte der Zellen wurde mit frischem Medium bzw. CSE versetztem Medium (1 % und 2 %) unter Zugabe von IL-2 aufgefüllt und für weitere 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen erneut gezählt und eine DAPI Färbung für die Bestimmung der Anzahl von toten Zellen durchgeführt. Der Rest der Zellen wurde mit PMA/Ionomycin und BrefA für 4 h restimuliert und mittels Oberflächenmarker und intrazellulärer Färbung im FACS analysiert (siehe Abb.6).

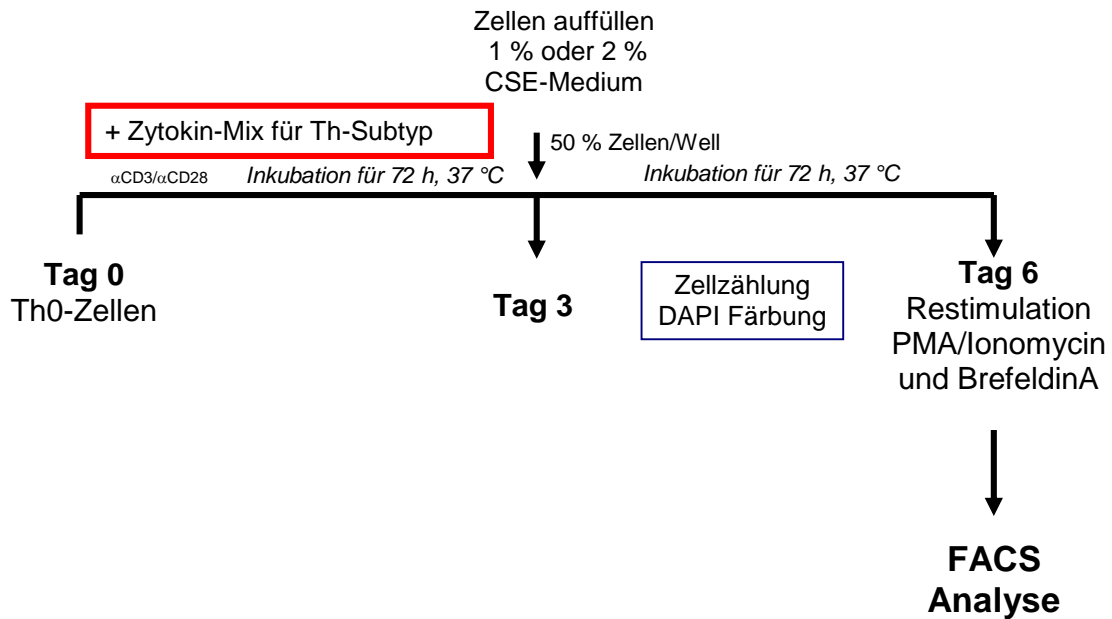


Abb.6: Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf bereits differenzierte Th-Subtypen

2.2.3 Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Splenozyten aus der Maus für *in vitro* Versuche

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und im Anschluss unter aseptischen Bedingungen die Milz entnommen, in eisgekühltem BSS zwischengelagert und fortan unter sterilen Bedingungen weiterbearbeitet.

Die Milz wurde mit 2 mL BSS auf ein Zellsieb (100 µm) in eine Petrischale überführt und anschließend mit einem Stempel (1 mL Spritze) vorsichtig durch das Sieb gerieben. Es wurden bis zu 4 Milzen gepoolt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit BSS auf 15 mL aufgefüllt und zentrifugiert. Zur Erythrozyten-Lyse wurde die Milzsuspension nach dem Verwerfen des Überstandes in 7 mL Ammoniumchlorid-Puffer bei RT resuspendiert und für 4 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 10 mL PBS + 1 % FCS und sofortige Zentrifugation. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Leukozyten-Pellet in 10 mL PBS + 1 % FCS aufgenommen. Schließlich wurde die Zellzahl mithilfe des Casy-Counters bestimmt.

2.2.3.2 Separation von CD4+ und CD4+CD62L+ Zellen

In der aus der Milz gewonnenen Zellsuspension und dem Lungenhomogenat wurden die CD4+ bzw. CD4+CD62L+ Zellen für die weiteren Versuche mit einer reinen Th-Zellsuspension separiert.

Magnetic Cell Sorting (MACS)

Für die positive Selektion wurde die Zellsuspension zunächst über den MACS Pre-Separation Filter (30 µm) filtriert. Maximal konnte eine Säule mit 2×10^8 Zellen beladen werden, wobei davon maximal 1×10^7 Zellen mit Beads markiert sein durften. Daher musste zunächst eine Zellzählung erfolgen um die geeignete Menge an Zellsuspension zu erlangen. Diese Menge wurde für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 90 µL MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und 10 µL CD4 (L3T4) Micro Beads pro 1×10^7 Zellen hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde gründlich gemischt und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Pro 1×10^7 Zellen wurde 1 mL MACS-Puffer zugegeben und erneut für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der ÜS verworfen. Zur Äquilibration wurde die MS-Säule auf eine magnetische Haltevorrichtung gesteckt und 2x mit 500 µL MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde über einen MACS Pre-Separation Filter (30 µm) filtriert, anschließend zentrifugiert, das Zellpellet in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und auf die vorbereitete Säule gegeben. Diese wurde 3x mit 500 µL MACS Puffer gespült. Der Durchlauf enthielt nun die CD4- Zellen, die CD4+ Zellen befanden sich noch in der Säule. Die Säule wurde nun von der magnetischen Haltevorrichtung genommen und auf ein 15 mL Tube transferiert. Dann wurde 1 mL MACS-Puffer auf die Säule gegeben und dieser zügig mit dem Stempel, zur Elution der CD4+ Zellen, durchgedrückt. Danach wurden die Zellen für weitere Arbeiten gezählt.

Bei der negativen Selektion wurden Micro Beads verwendet, die alle CD4- Zellen (CD8, B220, CD11b, CD11c, Ter119 und CD49b) markierten, so dass im ersten Durchlauf die CD4+ Fraktion vorhanden war und alle anderen Zellpopulationen an der Säule festgehalten wurden.

Selbst hergestelltes CD4 Isolierungssystem

Diese Variante der CD4+ Aufreinigung wurde im Labor von Prof. Lohoff der Philipps Universität in Marburg erfolgreich etabliert. Dabei wurden die biotinylierten Beads selbst hergestellt.

Biotinylierung der Beads:

Zunächst mussten die Magnetic Beads aufbereitet werden. Dazu wurden die Beads 4x über einen Magnet mit Bead-Puffer (PBS/ pH 7/ 0,1 % PEG 6000) gewaschen und in 50 mL Bead-Puffer bei 4 °C aufbewahrt. 10 mL von den Beads in Bead-Puffer wurden in RT gebracht und währenddessen 10 mL 1 mM Biotin-NHS angesetzt. Hierfür wurde 1 mL EtOH mit 1 mL aqua dest. gut gemischt und 30 µL 300 mM Biotin-NHS (in DMSO) hinzugegeben und wieder vermischt und zuletzt 8 mL Aqua dest. zugegeben. Anschließend wurden diese 10 mL 1 mM Biotin-NHS mit 10 mL Beads in Bead-Puffer für ein bis zwei Minuten auf dem Schüttler gemischt und 2 mL 10x Puffer, pH 8 (0,2 M Phosphat, 0,5 M Borat) hinzugegeben und wiederum für ein bis zwei Minuten geschüttelt. Dieser Ansatz musste für 1 h bei RT ruhen und wurde dann in 1,5 mL Reaktionsgefäßen auf die Magnetvorrichtung verteilt. Die Beads wurden dann 15x über den Magneten mit Bead-Puffer gewaschen und am Ende in 1 mL Bead-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Kopplung von anti FITC-AK

Für die Kopplung von anti FITC-AK wurde 1 mg Streptavidin mit 20 µL PBS/ 0,5 % BSA gemischt und 5x 10 µL Anti-Fluorescein isothiocyanate (FITC) Biotin nacheinander zu pipettiert und jedes Mal gut durchgemischt. Danach musste der Ansatz für mind. 24 h bei 4 °C ruhen. Die Gebrauchslösung wurde dann noch 1:100 verdünnt.

Kopplung Zelltyp spezifischer AK:

Verwendeter FITC-Antikörper Cocktail: (aus Stocklösung)

- 10 μ L FITC α -CD8 (spezifisch für zytotoxische T-Zellen)
- + 10 μ L FITC α -B220 (spezifisch für B-Zellen)
- + 10 μ L FITC α -CD11b (spezifisch für Makrophagen, Monozyten,
Granulozyten, NK-Zellen)
- + 10 μ L FITC α -CD11c (spezifisch für dendritische Zellen)
- + 10 μ L FITC α -Ter119 (spezifisch für Erythrozyten)
- + 10 μ L FITC α -CD49b (spezifisch für NK-Zellen)

Für die negative CD4⁺ Zellisolierung wurde das Zellpellet in MACS-Puffer (250 μ L/ 10^8 Zellen) resuspendiert und 3 μ L/ 10^8 Zellen FITC-AK Cocktail zugegeben. Nach intensiven Mischen wurde der Ansatz für 20 min bei 4 °C inkubiert und dann einmal mit MACS-Puffer für 5 min bei 1500 rpm gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ L/ 10^8 Zellen mit 1 μ L/ 10^8 Zellen Anti-FITC-Biotin/SA resuspendiert und nach gründlichem Mischen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde 2x mit MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 1500 μ L/ 10^8 Zellen mit 50 μ L/ 10^8 Zellen Biotin Micro Beads resuspendiert und für 20 min mit einer niedrigen Stufe auf dem Rotator im Kühlraum inkubiert. Anschließend musste das Reaktionsgefäß für 20 min bei RT an den Magneten. Nach der Inkubationszeit wurde die Suspension vorsichtig abgenommen, da sich die Beads mit den gebundenen CD4⁺ Zellen durch den Magneten am Rand des Reaktionsgefäßes angelagert haben. Für weitere Arbeiten wurden die Zellen gezählt und für die Bestimmung der Aufreinigungs-Effizienz der prozentuale Anteil von CD4⁺CD62L⁺ Zellen mittels Oberflächenfärbung im FACS bestimmt.

2.2.3.3 Stimulierung und Polarisierung der Zellen

Die antigenunabhängige Stimulation von T-Zellen erfolgte durch polyklonale Aktivierung mittels α -CD3 und α -CD28 Antikörpern. Zur Polarisierung von spezifischen Th-Subpopulationen wurde gleichzeitig Zytokin/AK-Cocktails zugegeben.

Zunächst wurden 24 Well-Zellkulturplatten mit α CD3 beschichtet. Dazu wurde mit 250 μ L/Well α CD3 [5 μ g/mL] verdünnt in Coating-Puffer (50 mM Tris-Base/ pH 9,5) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Wells 3x mit aufsteigendem Volumen PBS gespült (500 μ L/1000 μ L und 1500 μ L). Dann wurden 500 μ L/Well der aufgereinigten CD4+ Zellsuspension [2×10^6 Zellen/mL] ins Well vorgelegt.

Ansetzten der Zytokin-Mixe

Th0	Endkonzentration	Stammkonzentration
α -CD28	[1 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
rh IL-2	[50 U/mL]	[10000 U/mL]
Th1		
α -CD28	[1 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
α -IL-4	[10 %]	[100 %]
rm IL-12	[10 ng/mL]	[20 μ g/mL]
Th2		
α -CD28	[1 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
α -IFN γ	[5 μ g/mL]	[2,8 mg/mL]
rm IL-4	[20 ng/mL]	[20 μ g/mL]

Th9

α -CD28	[1 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
α -IFN γ	[5 μ g/mL]	[2,8 mg/mL]
rh TGF β 1	[2 ng/mL]	[1 μ g/mL]
rh IL-2	[100 U/mL]	[10000 U/mL]

Th17

α -CD28	[1 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
α -IFN γ	[5 μ g/mL]	[2,8 mg/mL]
α -IL-4	[10 %]	[100 %]
rh TGF β 1	[0,5 ng/mL]	[1 μ g/mL]
rm IL-6	[20 ng/mL]	[10 μ g/mL]

Treg

α -CD28	[0,5 μ g/mL]	[2,81 mg/mL]
α -IFN γ	[5 μ g/mL]	[2,8 mg/mL]
α -IL-4	[10 %]	[100 %]
rh TGF β 1	[2 ng/mL]	[1 μ g/mL]
rh IL-2	[100 U/mL]	[10000 U/mL]

Nach dem Ansatz der verschiedenen Zytokin-Cocktails wurden 500 μ L dieser Zytokin-Mixe zu den vorgelegten 500 μ L Zellsuspension zugegeben.

Zigarettenrauchmedium (CSE) [100 %] wurde in den entsprechenden Konzentrationen [1 % und 2 %] den Mischungen der Th-Subpopulation zugefügt.

2.2.3.4 Transfer und Restimulation

Nach 72 h wurde die Hälfte der Zellsuspension des Wells (500 μ L) entnommen und die Zellen im Casy-Counter gezählt und 50 μ L der Zellsuspension für eine DAPI Färbung in eine 96-Well Rundbodenplatte gegeben. Für die Restimulation wurden 500.000 Zellen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und in 1 mL Restimulationsmedium aufgenommen und für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die andere Hälfte der Zellsuspension des Wells (500 μ L) wurde weiterkultiviert und der Rest für die Restimulation eingesetzt. Für die Weiterkultivierung wurden die 500 μ L Zellsuspension mit Medium bzw. Medium + Zigarettenrauchmedium (1 % und 2 % CSE) wieder bis zu einem Endvolumen von 1 mL aufgefüllt und mit rh IL-2 50 U/mL [10000 U/mL] in eine neue, nicht mit α -CD3 gecoatete, Zellkulturplatte gegeben.

2.2.3.5 Proliferationstest

CFDA-SE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) wird von den Zellen passiv durch Diffusion aufgenommen und in der Zelle durch Esterasen zu CFSE konvertiert, welches an intrazelluläre Moleküle bindet. Durch anschließende Zellteilung nimmt der Gehalt an CFSE proportional zur Teilungsrate ab, wodurch die Proliferation mittels FACS (FITC-Kanal) gemessen werden kann.

Stimulierte Zellen (siehe Stimulierung und Polarisierung der Zellen) wurden in 37 °C warmen PBS auf 1×10^7 Zellen/mL eingestellt, 5 μ M CFSE (in PBS) zugegeben und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit fünffachem Volumen kaltem Medium aufgefüllt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit Medium gewaschen und auf 2×10^6 Zellen/mL eingestellt, 500 μ L Zellsuspension in die vorher α CD3 gecoatete Platte ausgesät und mit 500 μ L der subtyp-spezifischen Zytokin AK-Mixe (siehe Stimulierung und Polarisierung von Zellen) kultiviert. Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 144 h wurden die Zellen geerntet, mittels Oberflächenfärbung gegen CD4 gefärbt, 5 min mit DAPI inkubiert und im FACS analysiert. Wobei in der Darstellung des Histogramms jeder Peak für eine Filialgeneration (F) steht. Der Proliferationsindex wurde anhand der Histogramme der 72h differenzierten

Zellen ermittelt. Dafür wurden die Filialgenerationen in 8 Gruppen eingeteilt, die den Zellteilungen entsprechen. Dann wurde der entsprechende prozentuale Anteil der dort befindlichen Zellen ermittelt und mit der entsprechenden Zellteilungsgruppe multipliziert. Die Summe aus den Produkten ergibt den Index (Index = (1 x XY%) + (2 x XY%) +(8 x XY%))

2.2.3.6 Zellzählung

Die Zellzählung wurde teils manuell (Neubauer Zählkammer), überwiegend aber automatisiert mit einem Cell-Counter (CASY®) durchgeführt. Für die automatisierte Methode wurde die Zellsuspension entsprechend der jeweiligen Zellen (BAL: 1:200; Milz/Lunge: 1:2000) mit einer gerätespezifischen Salzlösung (CASY® Ton) verdünnt und mit dem spezifischen Messprogramm gemessen. Für die manuelle Methode wurden die Zellen 1:31 bzw. 1:11 mit Trypan-Blau verdünnt und 50 µL auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden zwei große Quadrate gezählt und dann die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

gezählte Zahl / 2 (Quadrate) * 31 bzw. 11 (Verdünnung) * X (vorhandenes Volumen der Zellsuspension) / 100 = Anzahl Zellen x10⁶

2.3 *in vivo*

2.3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die *in vivo* Versuche wurden männliche C57Bl/6 Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in den Räumen der Justus Universität Gießen in einem belüfteten Käfigsystem gehalten, die Raumtemperatur betrug 20 °C, es wurde ein künstlicher 12 h-Hell-Dunkelzyklus erzeugt.

2.3.2 Protokoll: Einfluss von Zigarettenrauch auf die Differenzierung der verschiedenen Th-Subtypen

C57BL/6 Mäuse wurden 6 h täglich, für 2 (Gruppe 3) oder 5 (Gruppe 2) Monate, an 5 Tagen in der Woche einer Konzentration von 140 mg/m³ Zigarettenrauch (Kentucky-Forschungszigaretten 3R4F) ausgesetzt (siehe Abb.7).

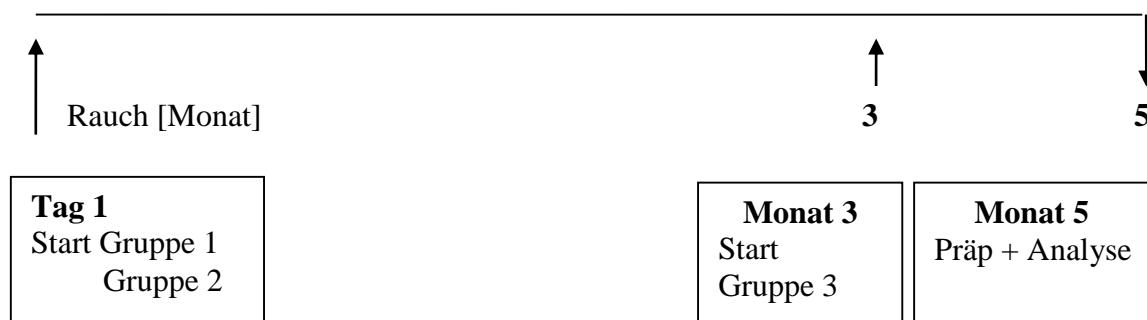


Abb.7: Protokoll für das chronische *in vivo* Maus - Rauchmodell zur Untersuchung des Einflusses von Zigarettenrauch auf die Differenzierung der verschiedenen Th-Subtypen

Zur Generierung des Zigarettenrauchs wurde ein Rauchgenerator der Firma Burkhart, aus Wedel (Typ: RGB-01) eingesetzt. Das Verrauchen von Zigaretten erfolgte mit anschließender Verdünnung dieses Hauptstromrauches mit Frischluft.

Als Kontrolle diente Gruppe 1, die während der gesamten Zeit des Experiments nur Raumluft ausgesetzt war.

Etwa 24 h nach der letzten Luft/Rauch Exposition, wurden zunächst am narkotisierten Tier der Lungenfunktionstest (Compliance und Resistance) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere getötet und endblutet. Das Serum wurde für die Bestimmung von anti-Elastin IgG-Titern herangezogen. Die BAL (Bronchoalveoläre Lavage) wurde nur an der rechten Lunge durchgeführt und für die Zellzahlbestimmung via Zytospins herangezogen. Die rechte Lungenhälfte, Lymphknoten und Milz wurden für FACS-Analysen entnommen. Die andere Hälfte der rechten Lunge wurde sofort bei – 80°C für qPCR Analysen gelagert. Die linke Lungenhälfte wurde über eine Instillationsapparatur mit gleichem Druck (mittels 20cm Wassersäule) mit 6%PFA befüllt. Diese Lungen wurden im Anschluss histologisch und morphometrisch untersucht.

2.3.3 Methoden

2.3.3.1 Gewinnung des mit Zigarettenrauch versetztem (CSE) Medium

Das CSE-Medium wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Ali Önder Yildirim aus dem *Comprehensive Pneumology Center* des Helmholtz Zentrum in München zur Verfügung gestellt.

Der Rauch von 1 Forschungszigarette (3R4F Kentucky University) wurde in einem geschlossenen System durch die Leistung einer Pumpe in 10 mL RPMI-Medium geleitet, anschließend das Medium durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Dieses Medium wurde als 100 % CSE-Medium definiert.

2.3.3.2 Probengewinnung aus Versuchstieren

2.3.3.2.1 Invasive Messung der Lungenfunktion

Die Messung der Lungenfunktionsparameter erfolgte invasiv mithilfe eines Kleintier-Kolbenhub-Respirators (flexiVent Fa.Sqirec (Montreal, Kanada)) unter kontrollierter Atemmanöver durchgeführt. Die Beatmungsfrequenz wurde bei 120/min volumenkontrolliert und drucklimitiert durchgeführt. Hierbei wurden das Tidalvolumen (TV) der Maus auf 10 ml/kg, der maximalen Druck (Pmax) auf 30 cm H₂O und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) auf 3 cm H₂O eingestellt. Zunächst wurde das Versuchstier durch die i.p. Injektion von 50 µl einer fünf fachen Narkoselösung (Gemisch aus Ketamin und Rompun (600 mg/kg Ketamin + 50 mg/kg Rompun)) anästhesiert. Nach Abflachen der Reflexe wurde die Trachea für die Intubation frei präpariert, über einen Schnitt in die Luftröhre wurde eine 20-Gauge (G) Stahlkanüle eingeführt und fixiert. Zur Unterbindung einer spontanen Atmung oder etwaiges Gegenatmen des Versuchstieres wurden 50 µl des Muskelrelaxans Esmeron intra muskulär (i.m.) appliziert. Nach Abflachen der spontanen Atmung wurde das Tier zunächst für 5 min ventiliert.

2.3.3.2.1.1 Bestimmung des Atemwegwiderstands (R) und der Lungencompliance (C)

Der Atemwegswiderstand (Resistance, R), wird aus dem Verhältnis der Druckänderung pro Stromgeschwindigkeit der Atemluft (*flow*) berechnet. Durch strukturelle Veränderungen kommt es zu einer Verdickung der Atemwegswand, woraus die Verkleinerung des Atemweglumens resultiert. Somit wird bei der Bewegung des gleichen Volumens in obstruierten Atemwegen ein erhöhter Druck aufgebaut, welcher sich in der Erhöhung des Atemwegswiderstands niederschlägt.

Die Compliance (C) dient als Maß der Dehnbarkeit des Gewebes und wird zur Beschreibung der elastischen Eigenschaften der Lunge herangezogen. Somit gibt sie an, wie viel Volumen in die Lunge gefüllt werden kann, bis der hierbei entstehende Druck um eine Druckeinheit ansteigt. Daher stellt dieser Parameter das Verhältnis zwischen Volumenänderung (ΔV) pro Druckänderung (Δp) dar.

Während besonders dehnbare Strukturen eine hohe C besitzen (Emphysem), zeigen besonders steife Strukturen niedrige Werte (Fibrose). Für jedes Tier wurden zehn Messungen vorgenommen, die für die Analyse gemittelt wurden.

2.3.3.2.2 Serumproben

Nach der Lungenfunktionsanalyse wurden die Versuchstiere durch Punktion der Bauchvene entblutet und Blut zur Serumgerinnung entnommen. Zur vollständigen Gerinnung wurden die Blutproben für mindestens eine Stunde bei 4-6 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 2000g und 4 °C zentrifugiert und die Serumüberstände vorsichtig abgenommen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.3.3.2.3 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) ist eine Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus peripheren und distalen Luftwegen der Lunge (Bronchial und Alveolarbereich). Nach der Lungenfunktion und Endblutung der Maus wurde der Brustkorb frei präpariert. Die linke Lungenhälfte wurde fest abgebunden. Über eine aufgesetzte 1 mL Spritze wurde 1 mL PBS mit Protease-Inhibitor langsam in die rechte Lungenhälfte appliziert, wieder entnommen und sofort auf Eis gestellt. Die BAL wurde für 10 min bei 350 g zentrifugiert, der zellfreie BAL-Überstand abgenommen und bei –20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 1 mL PBS/1 % BSA resuspendiert und die Zellzahl mittels Casy Counter bestimmt. Die wurden für Zytospin - und FACS-Analysen auf Eis aufbewahrt.

2.3.3.2.4 Perfundieren der Lunge

Um Zellen oder Mediatoren im Lungengewebe zu untersuchen, musste zunächst das Blut aus der Lunge entfernt werden, um Einflüsse durch zirkulierende Zellen / Mediatoren zu minimieren. Nach der BAL wurde der Verschluss zum linken Lungenflügel wieder geöffnet und anschließend die

Spitze einer Butterfly-Nadel in das rechte Atrium des Herzens geführt und über diese eine kalte 0,9 %ige Kochsalzlösung in den Lungenkreislauf zugeführt. Durch zyklisches Einblasen von Luft über die Tracheal-Kanüle wurde das Blut aus der Lunge gedrückt, bis diese ein blutfreies, weißes Erscheinungsbild aufwies. Dann wurde ein Teil der rechten Lungenhälfte für die Herstellung von Lungenhomogenat in Medium auf Eis gelagert und der andere Teil der rechten Lungenhälfte wurde in einem Cryoröhrchen für die qPCR Analysen bis zur Aufbewahrung bei -80 °C in Flüssigstickstoff schockgefroren.

2.3.3.2.5 Weitere Organpräparationen

Nach der Perfusion der Lunge und Entnahme der linken Lungenhälfte wurden die lokalen Lymphknoten und die Milz entnommen und zügig durch ein Sieb gedrückt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die linke Lungenhälfte wurde wie im *in vivo* Protokoll (siehe 2.3.2) beschrieben mit 6% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) befüllt und entnommen.

2.3.3.3 Probenweiterverarbeitung

2.3.3.3.1 Differenzierung von Leukozytenpopulationen der BAL

Zytospins wurden zur Differenzierung der Zellen aus der BAL hergestellt. Dazu wurden 50 µl der BAL-Zellen in PBS/1 % BSA in den Zelltrichter (Einsätze der Zytocentrifuge) pipettiert. Durch die Zentrifugation für 5 min bei 700 rpm wurden die Zellen auf einem Objektträger verteilt und die Flüssigkeit wurde durch ein Filterpapier aufgesogen. Die Präparate wurden 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und dann mittels Diff-Quick-Lösung gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop, bei 400-facher Vergrößerung, erfolgte dann die Zelldifferenzierung anhand morphometrischer Kriterien der einzelnen Zellsubtypen.

2.3.3.3.2 Lungenhistologie

Von der in PFA-fixierten Lunge wurden die noch vorhandene Trachea und das Herz entfernt. Anschließend wurde die Lunge in eine warme (37 °C) Lösung aus 2 % Agarose und 2 % Agar in Aqua dest. gegeben und 1 Stunde bei 4°C zur Härtung gekühlt. Nach dieser Festigungsphase wurde die Lunge gemäß dem „Systematic Randomized Uniform Sampling“ (SURS) Verfahren transversal in 6 mm dicke Scheiben geschnitten und in Reihe geordnet, in eine rechteckige Form gelegt und mit 2 %iger Agarose übergossen. Dieser Agaroseblock wurde dann in eine Einbettkassette überführt und paraffiniert. Die Einbettung der Lungen in Paraffin erfolgte im Institut für Pathologie der Universität. Von diesen Paraffin-Blöcken wurden mittels Mikrotom Schnitte von 3 µm Schichtdicke hergestellt.

Die Schnitte wurden nach einer Trockenzeit von mind. 24 h für 2 x 10 min in Xylolersatz getaucht und mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert (je 2 x 5 min 100 %, 5 min 96 %, 5 min 70 % Ethanol, spülen in Aqua dest.).

Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung durchgeführt.

Die Schnitte wurden dafür zunächst für 5 min in Hämatoxylin nach Gill III gegeben, dann folgte das Bläuen mit warmem Leitungswasser für 5 min, anschließend wurde mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss erfolgte die Eosin-Färbung für 2 min und das Spülen mittels Aqua dest.. Danach folgte die aufsteigende Alkoholreihe, zur Dehydrierung der Proben (1 min 96 %, 2 x 3 min 100 % Ethanol und 2 x 10 min Xylolersatz). Zum Schluss wurden die Proben mit Histomount eingedeckelt.

2.3.3.3.3 Gewinnung primärer Zellen aus verschiedenen Organen

Die Milz, Lymphknoten und ein Stück der Lunge wurden entnommen und wie unter 2.3.3.2 beschrieben bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das Lungestück wurde mit zwei Skalpelln gut zerkleinert, in 5 mL Medium (1 % Na Pyruvat, 8 % DNase und 8 % Collagenase A) aufgenommen und in ein 15 mL Tube überführt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und anhaltendem Schütteln wurde das Gemisch durch ein Nygonsieb (100 µm) gedrückt und nach Zentrifugation in 5 mL Medium (ohne die oben genannten Zusätze)

resuspendiert, erneut über ein Sieb gegeben und anschließend auf Eis gelagert. Zur Erythrozyten-Lyse wurde die Milz – und Lymphknotenzellsuspension und das Lungenhomogenat nach Verwerfen des Überstandes in 5 mL Ammoniumchlorid-Puffer bei RT resuspendiert und für 4 min inkubiert. Es folgte zur Abstopfung der Lyse die Zugabe von 10 mL PBS + 1 % FCS und eine sofortige Zentrifugation, so dass sich die noch intakten Zellen im Pellet am Röhrchenboden sammelten, während die fragmentierten Erythrozyten oberhalb blieben. Nach Dekantieren des Überstands wurden die Pellets in 10 mL PBS + 1% FCS aufgenommen und auf Eis gelagert. Schließlich wurden die Zellzahlen (von Milz, Lungenhomogenat und Lymphknoten) mithilfe des Casy Counters bestimmt (siehe 2.2.3.6). Anschließend wurden die Zellen für 4 h mit BrefA/ PMA und Ionomycin für die FACS Messungen restimuliert.

2.4 analytische Methoden

2.4.1 Proteinbiochemie

2.4.1.1 Färbungen für Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

2.4.1.1.1 Oberflächenfärbung

Die Oberflächenfärbung kann mit lebenden und in Abhängigkeit vom AK auch an fixierten Zellen erfolgen. Dabei werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern markiert, die so die Analyse ermöglichen.

Für diese Färbung wurde eine Zellsuspension mit ca. 1×10^6 Zellen für 5 min und 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet für einen weiteren Waschschrift in 1 mL MACS-Puffer (PBS + 0,5 % BSA und 2 mM EDTA) resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 50 µL AK-Lösung suspendiert und bei RT für 20 min inkubiert.

Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit je 500 µL MACS-Puffer. Anschließend wurde das Pellet für die Messung am FACS in 150 µL – 200 µL MACS-Puffer gelöst.

Verwendete Oberflächenfärbungen

(Ansatz mit Stocklösungen, Konzentration siehe Tab. 4)

1:100 CD4 APC

1:100 CD62L PE

1:50 CD4 APC

1:20 CD8a FITC

1:50 CD3 PE

1:20 CD45 PercP

1:20 CD45 PercP

1:20 SiglecF PE

1:20 F4/80 APC

1:20 GR-1 FITC

2.4.1.1.2 Intrazelluläre Färbung (ICS)

ICS ist eine Methode, um die spezifische Zytokinsynthese individueller Zellen innerhalb einer Population am FACS zu messen. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erreichen wurden die Zellen vor der Färbung für 4 h unspezifisch mittels PMA/ Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A stimuliert. Letzteres verhindert die Sekretion der Zytokine durch limitierter anterograder Transportmechanismen. Anschließend werden die Zellen fixiert und die Zellmembranen mit dem pflanzlichen Detergenz Saponin perforiert. Nun können mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper in das Zytoplasma eindringen, an die Interleukine binden und somit einen Nachweis ermöglichen.

Für die praktische Durchführung wurde eine Zellsuspension von ca. 1×10^6 Zellen für 5 min bei 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 1 mL 2 % PFA Lösung zur Fixierung aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Pellet nach wiederholtem Zentrifugationsschritt in 1 mL Saponin-Puffer (0,3 % Saponin/ 2% FCS/ PBS) resuspendiert und wieder zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 µL Farbmischung aufgenommen. Zu jeder Probe wurden 10 µL Fc-Block (1:100 verdünnt in Saponin-Puffer) zugegeben und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 500 µL Saponin-Puffer zugefügt und zentrifugiert. Das Pellet wurde für einen weiteren Waschschrift in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet für die Messung am FACS in 150 µL – 200 µL MACS-Puffer gelöst.

Die Zellen für die Foxp-3 Färbungen wurden mit extra Foxp-3 Färbungs-Kit fixiert und statt Saponin-Puffer wurde 1 x Permeabilisierungspuffer verwendet.

Verwendete Farbmixe

(Ansatz mit Stocklösungen, Konzentration siehe Tab. 4)

Mit 1 x Permeabilisierungspuffer für Foxp3

1:300 CD4 APC

1:300 Foxp-3 PE

Mit Saponin-Puffer

1:300 CD4 APC und

1:300 IL-4 PE

oder

1:500 IFN γ PE

oder

1:500 IL-17 PE

oder

1:300 IL-9 PE

1:300 CD4 APC

1:200 IFN γ FITC

1:300 IL-9 PE

1:300 CD4 APC

1:200 IL-17 FITC

1:300 IL-4 PE

2.4.1.1.3 Lebend-Tot-Färbung

Für die Lebend-Tot-Färbung an frischen Zellen wurde nach durchgeführter Oberflächenfärbung 1 µL DAPI [10 µg/mL] zur Probe gegeben und die Zellen nach 5 min Inkubationszeit im Dunkeln, ohne nochmaligen Waschschrift am FACS gemessen.

Für die Lebend-Tot-Färbung an fixierten Zellen wurde das Zellpellet vor der Fixierung für die Intrazellulärfärbung in 1 mL PBS resuspendiert und mit 1 µL des gelösten Farbstoffs des Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kits für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entsprechend dem Protokoll zur intrazellulären Färbung fixiert.

Zur Bestimmung der Toxizität des Zigarettenrauchmediums (CSE) wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Konzentrationen an CSE-Medium mittels Lebend-Tot-Färbung untersucht.

2.4.1.2 Durchflusszytometrie

2.4.1.2.1 FACS

Im FACS werden suspendierte Einzelzellen einen Lichtstrahl (Laser) geleitet und entsprechend ihrer Färbung detektiert. Zunächst wurde eine ungefärbte Probe gemessen, um die Spannung der verschiedenen Kanäle richtig einzustellen. Im Anschluss wurden die Isotypkontrollen zu den jeweiligen Farben gemessen und die Spannung, falls nötig, noch einmal reguliert. Dann wurden die gefärbten Proben durchgemessen und die Spannung nicht mehr geändert. Wenn möglich wurden 50.000 Events, aber minimal 10.000 Events, pro Probe aufgenommen. Hierfür wurde zunächst ein Gate um die Zellen gelegt, wo sich die Lymphozyten befinden. Von diesem Gate wurde dann die spezifische Einteilung von CD45, CD4 oder CD8 vorgenommen und von dieser Population dann die Unterpopulationen analysiert. Falls es eine mehrfarbige Messung war, wurde die Kompensation nach der Messung durchgeführt. Zum Schluss wurden die Proben mit der FACS Diva Software analysiert und als PDF-Datei ausgedruckt und abgeheftet.

2.4.1.2.2 FACS Cell Sorting

Das FACS Sort Gerät arbeitet nach demselben Prinzip wie das FACS, nur zusätzlich kann dieses Gerät die gewünschte Zellpopulation steril aus der Zellsuspension sortieren. Mit der so gewonnen reinen Zellpopulation kann nun in der Zellkultur weitergearbeitet werden.

Die Durchführung erfolgte in Kollaboration mit der AG von Prof. Lohoff.

Für den FACS Sort müssen die Zellen steril gefärbt werden. Nach dem Sort wurden die aufgereinigten Zellen auf Eis für die weitere Bearbeitung mir zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden für die Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von hoch aufgereinigten naiven CD4+ Zellen (siehe 3.1.3) verwendet.

2.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen

2.4.1.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zunächst wurde die ELISA Platte mit dem entsprechendem Coatingantikörper (50 µL/ Well) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Platte vier Mal mit dem Waschpuffer (WP) (PBS + 0,1 % Tween 20) gewaschen und 100 µL pro Well Blockpuffer aufgetragen und für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Standardreihe und Proben vorbereitet Nach der Inkubationszeit wurde die Platte drei Mal mit dem WP gewaschen, je 50 µL Probe bzw. Standard pro Well aufgetragen und erneut 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Platte vier Mal mit WP gewaschen und 50 µL des zweiten AK pro Well pipettiert und 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Platte vier Mal mit WP gewaschen und 50 µL (25 µL Streptavidin HRP in 5 mL Probenpuffer) ins Well pipettiert und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum letzten Mal wurde die Platte acht Mal mit WP gewaschen und 100 µL pro Well von der Substratlösung (Peroxidase, POD) zugegeben und im Dunkeln inkubiert (max. 30 min) bis eine Blaufärbung zu sehen war. Zum Schluss wurde diese Reaktion mit 50 µL pro Well 2 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch man einen Umschlag von blau in

gelb sehen konnte. Die Platte wurde dann bei 450 nm am Tecan Reader gemessen und mit der Software Magellan 3 analysiert.

Spezifische Reagenzien der verwendeten ELISAs:

Transforming growth factor beta1 (TGF β 1)

1. AK: anti-*mouse* TGF β 1 [4 μ g/mL] in PBS
2. AK: biotinylierter *chicken*-anti TGF β 1 [75 ng/mL] in Probenpuffer

Standard: rekombinantes TGF β 1 in Probenpuffer verdünnen 1:2

Verdünnungsreihe, Start: [2000 pg/mL]

Probenpuffer: PBS/ 1 % BSA/ 0,05 % Tween 20

Blockpuffer: PBS/ 5 % Tween 20

Besonderheit: Die Proben mussten aktiviert werden. Dafür wurden 100 μ L der Probe mit 20 μ L 1 M HCL gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit 20 μ L 1,2 M NaOH/0,5 M HEPES gestoppt. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor von 1:1,4 wurde bei der Analyse beachtet.

Interferon gamma (IFN γ)

1. AK: *rat*, anti-*mouse* IFN γ [3 μ g/mL] in Coatingpuffer
2. AK: biotinylierter anti-*mouse* IFN γ [1 μ g/mL] in Probenpuffer

Standard: rekombinantes IFN γ in Probenpuffer verdünnen 1:2

Verdünnungsreihe, Start: [10 ng/mL]

Coatingpuffer: 0,1 M NaHCO₃

Probenpuffer: PBS/ 0,1% Tween 20

Blockpuffer: PBS/ 1 % BSA

Interleukin 9 (IL-9)

1. AK: *rat*, anti-*mouse* IL-9 [2 μ g/mL] in Coating Puffer
2. AK: biotinylierter hamster anti-*mouse* IL-9 [1 μ g/mL] in Probenpuffer

Standard: rekombinantes IL-9 in Probenpuffer verdünnen 1:2

Verdünnungsreihe, Start: [1 ng/mL]

Coatingpuffer: 0,1 M NaHCO₃

Probenpuffer: PBS/ 0,05% Tween 20

Blockpuffer: PBS/ 3 % BSA

2.4.1.3.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Die neue und innovative CBA-Technologie ermöglicht die quantitative Bestimmung von Zytokinen, Chemokinen oder auch Phosphoproteinen. Im Vergleich zur ELISA- und auch zur Western-Blot-Technik bietet das Verfahren jedoch die Möglichkeit der simultanen Quantifizierung, z. B. verschiedene Zytokine aus einer geringen Menge Probenmaterial (50 µL).

Verwendete Maus-Zytokin-Flex-Sets von BD Biosciences:

TNF, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL17A, und IL-21

Für die Vorbereitung der Standards wurden die Zytokin spezifischen Standard-Beads in einem FACS Röhrchen in 1 mL Assay-Diluent suspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:1024 hergestellt. Assay-Diluent diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden aufgetaut und unverdünnt und 1:5 verdünnt eingesetzt. Die Zytokin spezifischen Capture Bead Stocks wurden gut gemischt, um die Beads zu resuspendieren. Pro Well wurde 1 µL Capture Bead pro Zytokin zupipettiert und dann das Gesamtvolumen mit 30 µL Capture-Bead-Diluent auf 40 µL aufgefüllt. Zu diesen 40 µL wurden pro Well 50 µL Standard bzw. Probe hinzugefügt. Die Platte wurde für 5 min bei 500 rpm geschüttelt und dann für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die PE markierten Sekundär-AK wurden in der Zwischenzeit gut gemischt und 1 µL davon pro Zytokin verwendet und mit 30 µL PE Detektions-Reagent-Diluent auf 40 µL aufgefüllt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde dieser Ansatz bei 4 °C gelagert. Nach der Inkubationszeit wurden diese 40 µL PE Detektionsansatz pro Well pipettiert und die Platte erneut für 5 min bei 500 rpm geschüttelt und 2 h im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Platte für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 200 µL WP ins Well gegeben und die Platte wurde erneut zentrifugiert und der ÜS erneut verworfen. Zum Schluss wurden 180 µL WP ins Well gegeben und die Platte ein letztes Mal für 5 min bei 500 rpm geschüttelt. Dann erfolgte die Messung am FACS Array Bioanalyser.

2.4.1.4 Proteinnachweis mittels Western Blot

Folgende proteinbiochemischen Methoden wurden mit den von mir gewonnenen Proben von Frau Dr. Fröbuis (Mitarbeiterin AG Garn, Institut für Laboratoriumsmedizin, in Marburg) durchgeführt.

2.4.1.4.1 Protein- Isolierung

Bei -80 °C gelagerte Zellpellets von je 2×10^6 Zellen wurden in 100 µL RIPA-Puffer aufgenommen und für 15 min unter ständiger Rotation bei RT lysiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteinfraction enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.4.1.4.2 Protein- Fällung und Konzentrationsbestimmung mittels BCA

Dem Zelllysat wurde nach der Protein-Isolierung das Vierfache Volumen an eisgekühltem Aceton (400 µL) beigemischt und für 2 h bei -20 °C inkubiert. Durch diesen Fällungsschritt wurde den Proteinen die Hydrathülle entzogen. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das Aceton vorsichtig abgenommen. Das luftgetrocknete Pellet wurde mit 30 µL 1x Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Proteinbestimmung wurde mittels kolorimetrischem Bichinonic-Assay (BCA), laut Herstellerangaben, durchgeführt.

Die folgenden zwei Methoden wurden nur von Frau Dr. Fröbuis praktisch durchgeführt, daher erfolgen keine Durchführungserklärungen zu diesen Schritten, sondern nur kurze Erklärungen zur Methode.

2.4.1.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, PVDF-Membran, übertragen werden. Diese Übertragung beschreibt den Begriff „Blot“.

Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern, Lectinen oder Enzymsubstraten zugänglich sind, erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik nicht nur auf einfache Weise qualitative und quantitative Bestimmungen einzelner Proteine, in einem komplexen Gemisch anderer Proteine, sondern auch deren Identifikation.

2.4.1.4.4 Strippen von PVDF- Membranen

Um auf einer bereits verwendeten Membran noch ein weiteres Protein immunologisch zu detektieren, wurde die PVDF-Membran „gestrippt“.

2.4.2 Molekularbiologische Methoden

2.4.2.1 RNA-Aufreinigung

Die Zellpellets wurden mit 350 µL RLT Puffer + 1 % β -MCE bei – 80 °C weggefroren, da das β -MCE die RNA stabilisiert und eine RNA-Aufreinigung zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Das Lungengewebe wurde in einem Cryoröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung ebenfalls bei – 80 °C gelagert. Die zelluläre RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert.

Die in RLT Puffer + 1 % β -MCE versetzten Zellen wurden aufgetaut und gleiches Volumen (350 µL) 70 %iger Ethanol zugegeben, gemischt und auf eine Mini Säule gegeben. Das Lungengewebe wurde mit einem Mörser und 350 µL RLT Puffer + 1 % β -MCE homogenisiert, mittels 1 mL Spritze in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 350 µL 70 %igem Ethanol aufgefüllt, gemischt und auf eine Mini Säule gegeben. Diese Säulen wurden 1 min bei 8000 rpm und RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulen wurden dann auf ein neues Collection Tube gesetzt und 700 µL RW1 Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Säulen wieder zentrifugiert, der Durchlauf erneut verworfen und dann die Säulen zwei Mal mit 500 µL RPE Puffer gespült. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte für 2 min bei 13000 rpm und RT. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, wurden die leeren Säulen nochmals für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert und die Säulen anschließend auf ein neues

1,5 mL Reaktionsgefäß (RNase frei) überführt. Dann wurden 30 µL RNase freies Wasser auf die Mitte der Membran von den Säulen gegeben und 1 min bei 8000 rpm und RT zentrifugiert. Dieser Durchlauf wurde erneut auf die Säulen aufgetragen und zentrifugiert. Der resultierende Durchlauf enthielt die eluierte RNA. Die RNA-Konzentration wurde durch spektrophotometrische Messung mittels Nano-Drop ermittelt und die RNA für weitere Arbeiten bei -80 °C gelagert.

2.4.2.2 DNA Verdau

Zur Eliminierung kontaminierender DNA wurde anschließend noch eine Inkubation mit DNase I durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 2,5 µL DNase Puffer und 1 µL DNase 1 zugegeben und der Ansatz gut gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde 1 µL EDTA zugefügt, gemischt und für weitere 10 min nun bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und die RNA-Konzentration bzw. das Verhältnis von 260/280 nm am Nano-Drop gemessen und für weitere Arbeiten bei -80 °C gelagert.

2.4.2.3 cDNA Synthese aus aufgereinigter mRNA

Zur mRNA-Expressionsanalyse wurden mRNAs mittels Omniscript RT Kit von Qiagen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA kann dann in der qPCR zur Vervielfältigung und Quantifizierung eingesetzt werden. Hierzu wurde die RNA mit Oligo (dT)18-Primern, RT-Puffer, dNTP's, ORT und Wasser versetzt. Zuerst wurde der Ansatz auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Die Primer hybridisieren mit dem Poly-A-Schwanz der mRNAs bei der Abkühlung auf 4 °C. Nun kann eine Reverse-Transkriptase den RNA Strang in DNA umschreiben, wofür noch Nukleotide im Überschuss, ein RNase-Inhibitor und ein entsprechender Puffer benötigt werden.

Die aufgereinigte RNA wurde mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 500 ng in einem Volumen von 10 μ L eingestellt. Folgende Reagenzien wurden zu einem Endvolumen von 20 μ L hinzugefügt:

- RT-Puffer	2 μ L
- dNTP's	2 μ L
- Oligo dT 18	1 μ L
- ORT	1 μ L
- Wasser	4 μ L

Dieser Ansatz wurde gut gemischt, kurz anzentrifugiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgten 5 min bei 93 °C und bis zur Entnahme der Proben aus dem Gerät (Biometra) wurden sie bei 4 °C gekühlt. Die resultierende cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.2.4 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR wurde in einem Gerät durchgeführt, das aus einer Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektion besteht (RotorGene™3000 von Corbett). Die PCR wurde mit dem QuantiTect™SYBR®Green-Kit durchgeführt.

Um die Expressionsunterschiede von in cDNA umgewandelter mRNA zwischen unterschiedlichen Proben vergleichen zu können, wurde zusätzlich zu dem „Gene of interest“ auch die Anzahl von mRNA Kopien eines „Housekeeping-Genes“, hier L32 (60S ribosomal protein L32), bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass Housekeeping-Gene in jedem Zelltyp zu jeder Zeit gleichmäßig exprimiert werden. Somit lassen sich durch die Bildung einer Subtraktion aus Expression der zu untersuchenden mRNA mit der Expression des Housekeeping Gens die Proben normalisieren. Anschließend wurde die relative Expression der Gene noch auf das Niveau der Kontroll-Zellen (Th0 bzw. Th Subtyp) kalibriert. Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung nach der $\Delta\Delta C_T$ Methode (Livak und Schmittgen 2001) berechnet.

Für die quantitative PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

Master Mix (MM): pro Probe 5 µL QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
+ 0,5 µL sense Primer (10 pmol)
+ 0,5 µL antisense Primer (10 pmol)
+ 3,5 µL RNase freies Wasser

9 µL MM + 1 µL cDNA (aus Reversen Transkription) wurden gekühlt in ein gerätespezifisches Probengefäß pipettiert und ins Gerät gestellt.

Das Programm für den RotorGene sah folgendermaßen aus:

Aktivierungs-Schritt:	15 min	95 °C	
Denaturierung:	15 sec	94 °C	
Annealing:	30 sec	58-62 °C	
Extension:	30 sec	70 °C	40-45 Zyklen

Schmelzkurve:

schnelles Hochheizen auf 95 °C, dann schnelles Abkühlen auf 72 °C

Temperaturgradient 72 °C bis 95 °C in Intervallen von 0,1 °C

Abkühlen auf 40 °C

Die optimale Annealing-Temperatur ist Primer-abhängig und wurde für jeden Primer in Vorversuchen getestet. (spez. Temperatur siehe Tab.7 Primer)

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung, die graphische Darstellung der Datenanalyse und die Berechnung der Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® (Version 5, Firma: Graph Pad Software) durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für die Berechnung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen bezüglich ihrer statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige T-Test verwendet. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant festgelegt. Als Streuungsmaß der qPCR wurde die Standardabweichung nach der $\Delta\Delta C_T$ Methode (Livak und Schmittgen 2001) berechnet.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Beschreibung des Einflusses von CSE-Medium auf die Differenzierung von murinen naïven CD4⁺ Zellen in verschiedene Th Subtypen (Th1/ Th2/ Th9/ Th17 und Treg). Außerdem sollte der Einfluss von CSE-Medium auf die Funktion bereits differenzierter Th Subtypen untersucht werden. Die Übertragbarkeit der *in vitro* Beobachtungen wurde anhand eines murinen Modells mit Zigarettenrauchexposition *in vivo* überprüft.

Diese Untersuchungen dienen der Aufklärung von bei COPD-Patienten zugrunde liegenden (durch Zigarettenrauch induzierte) Pathomechanismen, die hinsichtlich der pathologischen Änderungen in der CD4⁺ Zelldifferenzierung bisher nur unzureichend untersucht sind.

3.1 Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen

3.1.1 Einfluss von CSE-Medium auf Vitalität und Proliferation primärer muriner CD4⁺ Zellen

Vitalität

Zunächst wurden die toxischen Grenzwerte des verwendeten CSE-Mediums (CSE) auf primäre CD4⁺ Zellen bestimmt. Hierzu wurden naïve CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen isoliert, mit α CD3/ α CD28 und IL-2 stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen CSE kultiviert. Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit 100 %igen Ethanol fixiert. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach 6, 24, 48 und 72 Stunden. Als Analyseparameter wurde die Lebend-Tot-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet. Dieser Farbstoff gelangt nur in tote Zellen, da deren Membranintegrität gestört ist. Die ermittelten Werte wurden in Bezug gesetzt zur Positivkontrolle (CSE-unbehandelte stimulierte Zellen) und relativ dargestellt (siehe Abb. 8).

In diesem Versuch konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Toxizität für CSE festgestellt werden, die nach 48 h stagnierte (siehe Abb. 8). Nach 6 h

Inkubation mit 10 % CSE waren nur noch 26 % der Zellen vital. Weitere 18 h später (24 h Inkubation) konnten keine lebenden Zellen nach Inkubation mit 10 % CSE nachgewiesen werden. Die Behandlung mit 5 % CSE bewirkte einen Rückgang von 96 % (6 h) auf 22 % (24 h) lebende Zellen. Nach 48 h Inkubation wurde eine Vitalitätsrate von 0 % bei den mit 5 % CSE behandelten Zellen nachgewiesen und die Vitalität nach Behandlung mit 2,5 % CSE sank von 63 % (24 h) auf 42 % (48 h) lebende Zellen. Bei geringeren CSE Konzentrationen war der prozentuale Rückgang von lebenden Zellen deutlich geringer. Eine Verlängerung der Inkubation von 48 h auf 72 h bewirkte keine weiteren Unterschiede in der Vitalität.

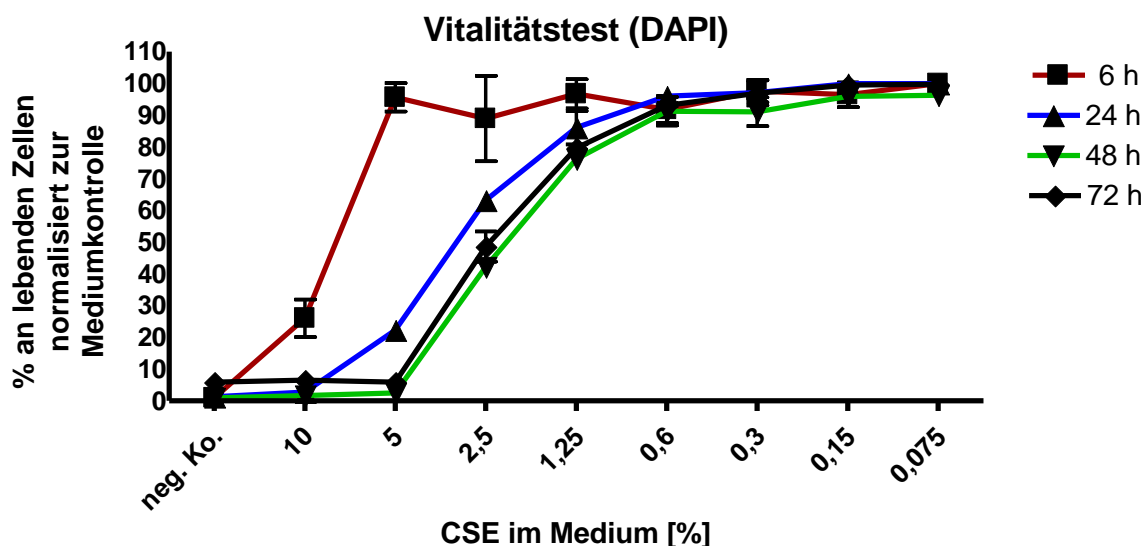


Abb. 8: Bestimmung der toxischen Grenzwerte des CSE-Mediums

Aufgereinigte naïve CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit absteigenden Konzentrationen (10 – 0,075 %) an CSE-Medium für 6, 24, 48 und 72 h mit α CD3/ α CD28 und IL-2 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde den Zellen 50 μ L 100 %iger Ethanol zugefügt und die Positivkontrolle wurde ohne CSE-Medium kultiviert. Die im FACS ermittelten Werte wurden zur Positivkontrolle normalisiert und sind als Prozentwert dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen

Anhand dieser Ergebnisse wurden zwei Konzentrationen an CSE gewählt, um die folgenden Versuche der vorliegenden Arbeit durchzuführen. Zum einen wurde die Konzentration von 1 % CSE gewählt, da bei dieser Konzentration nur marginale Einflüsse von CSE auf die Vitalität der Zellen festgestellt wurden. Zum anderen wurde die Konzentration von 2 % CSE verwendet, da hier nach 72 h der halbmaximale toxische Effekt nachgewiesen wurde und somit ein größerer Effekt von CSE zu erwarten war.

Proliferation

Mit den festgelegten CSE Konzentrationen wurde nun der Einfluss auf die Proliferation der einzelnen Th Subtypen bestimmt. Hierfür wurden naive CD4+ Zellen aus der Milz aufgereinigt, mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) markiert und mit spezifischen Zytokin-Mixen in die entsprechenden Th Subtypen polarisiert (Th0/ Th1/ Th2/ Th17 und Treg). Die intrazelluläre Verdünnung des Farbstoffes bei der Zellteilung wurde durchflusszytometrisch gemessen. Der Farbstoff diffundiert passiv in die Zellen und bindet an intrazelluläre Moleküle. Durch eine Zellteilung wird auch der Gehalt an CFSE in der Zelle geteilt und an die nächste Filialgeneration weitergegeben. So kann man im FACS anhand der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen *Peaks* den prozentualen Anteil der geteilten Zellen in den verschiedenen Filialgenerationen ermitteln. Zunächst wurde an Tag 0 der Ausgangswert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des aufgenommenen CFSE bestimmt. Die MFI wurde von den lebenden Zellen (DAPI negativ) nach 24, 48, 72 und 144 h für alle Th Subtypen gemessen (siehe Anhang Abb. S1-5).

Während nach 24 h noch keine Proliferation festgestellt werden konnte, hatten sich die Zellen nach 48 h ein- bis zweimal geteilt, was durch die entstandenen *Peaks* in den Histogrammen zu erkennen war (siehe Anhang Abb. S1-5). Durch die Einteilung der einzelnen *Peaks* in verschiedene Filialgenerationen (F1-8) konnte durch die geringere Anzahl entstandener *Peaks* deutlich gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Th Subtypen nach Zugabe von 2 % CSE weniger oft geteilt haben (siehe Abb. 9A). Dies wurde auch durch eine höhere gesamte MFI von circa 55.000 für alle mit 2 % CSE kultivierten Th Subtypen bestätigt (siehe Abb. 9B). Im Gegensatz dazu wurde bei den Th Subtypen, die mit 1 % CSE oder ohne CSE kultiviert wurden eine geringere MFI ca. 40.000 (1% CSE) und ca. 20.000 (Medium) detektiert (siehe Abb. 9B). Für die Ermittlung des Proliferationsindex wurde der entsprechende prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Filialgenerationen (F1-8) ermittelt und mit der Anzahl der Zellteilungen (1-8) multipliziert. Die Summe aus diesen Produkten ergab den in Abb. 10 dargestellten Proliferationsindex.

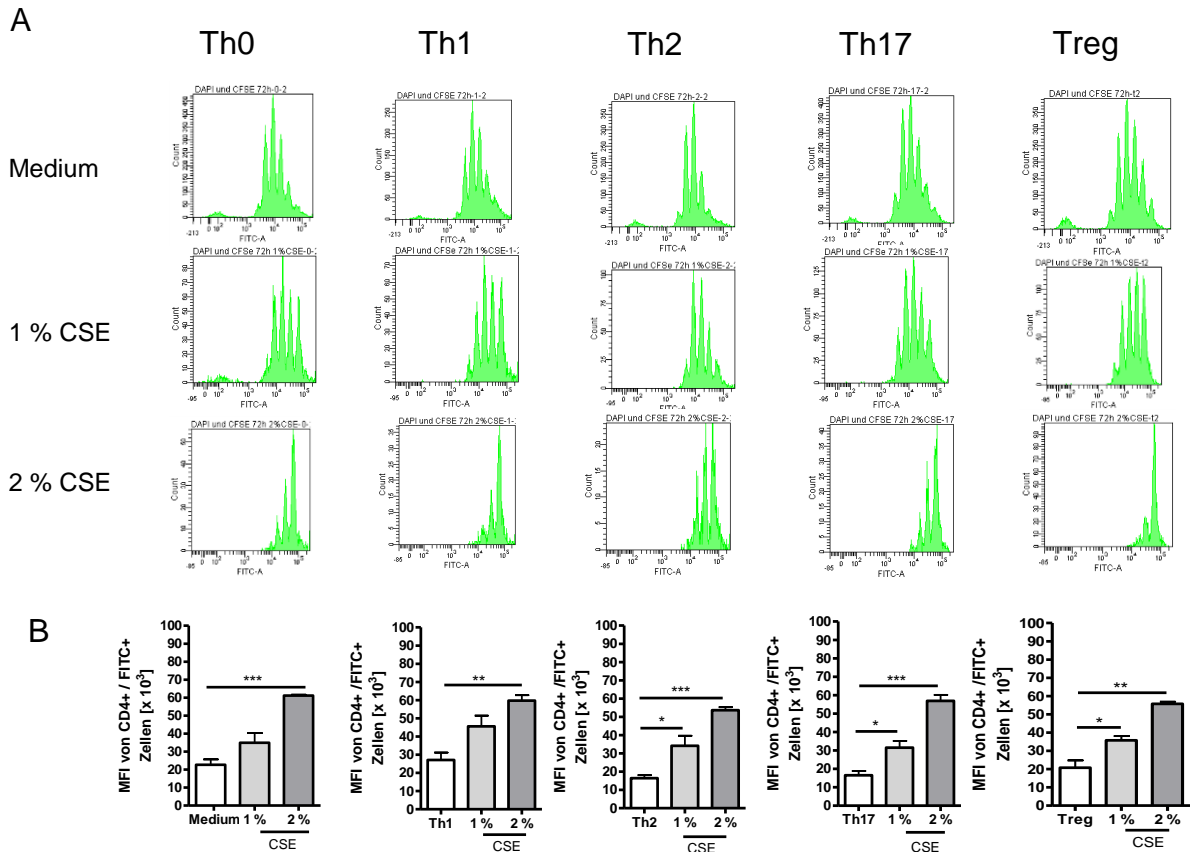


Abb. 9: Einfluss des CSE-Mediums auf die Proliferation verschiedener Th Subtypen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 + IL-2 (Th0) \pm CSE bzw. mit dem jeweiligen Zytokin-Mix (Th1/Th2/Th17 und Treg) \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) nach 72 h Kultivierung (A) repräsentative Histogramme und (B) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen; *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

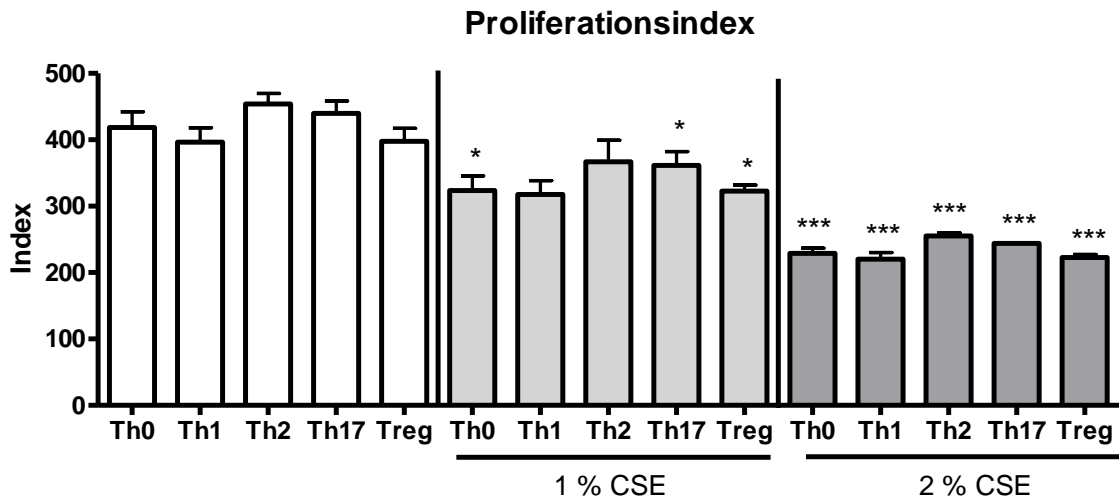


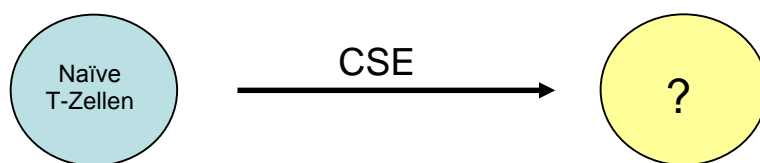
Abb. 10: Proliferationsindex differenzierter Th Subpopulationen nach Inkubation mit CSE nach 72 h

Daten wurden mittels CFSE-Histogramme (Abb. 2B) berechnet. Das Histogramm wurde in 8 Filialgenerationen eingeteilt und der prozentuale Anteil der dort befindlichen Zellen bestimmt. Die Summe der Produkte der prozentualen Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Filialgeneration (F1-8) ergab den Index-Wert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen, *p<0,05 und ***p<0,001 bezogen auf die Population ohne CSE

Im Allgemeinen konnte man anhand des Proliferationsindex zum 72 h Zeitpunkt sehen, dass mit steigender CSE Konzentration die Proliferation aller Th Subtypen (Th0/ Th1/ Th2/ TH17 und Treg) signifikant verzögert wurde (siehe Abb. 10). Bei Th1 und Th2 Zellen ergaben sich durch die Zugabe von 1 % CSE noch keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsindex, aber für 2 % CSE zeigten sich signifikante Verzögerungen.

Für den 144 h Zeitpunkt konnte allerdings gezeigt werden, dass sich die mit 1 % und 2 % CSE kultivierten Zellen genauso oft geteilt hatten wie die Kontrollgruppen ohne CSE (siehe Anhang Abb. S1-5). Zusammenfassend ist damit nachgewiesen, dass CSE in steigender Konzentration die Proliferation zunehmend initial verzögert, aber nicht gänzlich hemmt.

3.1.2 Untersuchungen zur potentiellen Induktion einer T-Zelldifferenzierung durch CSE-Medium



Für die Untersuchungen zur Klärung der Fragestellung, welchen Effekt CSE während der Expansion von Th0 Zellen unter nicht polarisierenden Bedingungen hat, wurden naïve CD4⁺ Zellen aus den Milzen von C57Bl/6 Mäusen isoliert. Die Effizienz der Aufreinigung wurde im FACS mit den Oberflächenmarkern für naïve CD4 Zellen bestimmt (CD4-APC und CD62L-PE).

Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit Reinheiten von mindestens 80 % CD4⁺CD62L⁺ Zellen durchgeführt (siehe Abb. 11A). Anschließend wurden in den restlichen ca. 20 % der aufgereinigten Zellen (CD4⁺CD62L⁻) der Anteil bereits differenzierter CD4⁺ Subpopulationen bestimmt (siehe Abb. 11B). Der größte Anteil waren mit 11 % IFN γ ⁺ Zellen, gefolgt von 2,8 % Foxp-3⁺; 1,9 % IL-17⁺ und 1,2 % IL-4⁺ Zellen.

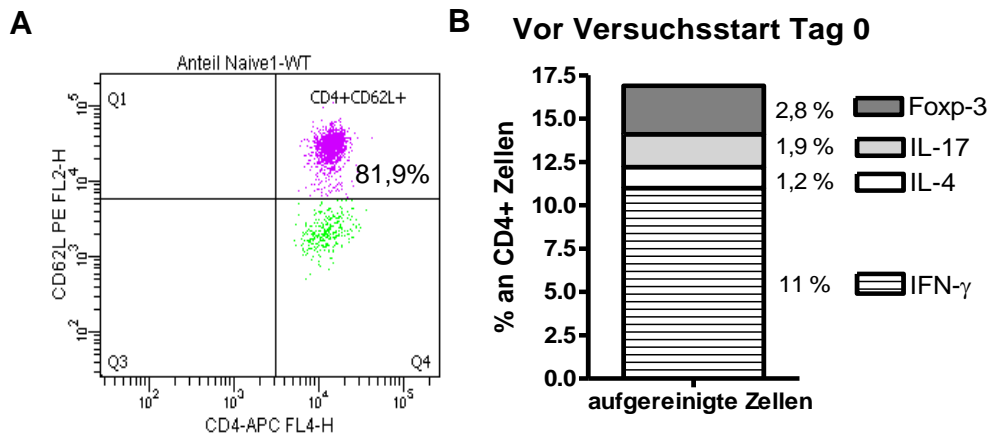


Abb. 11: Reinheit von aufgereinigten naiven CD4+ Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden im FACS mit anti-Maus CD4-Antikörper (APC) und anti-Maus CD62L-Antikörper (PE) gefärbt um die Reinheit zu bestimmen (A). Die aufgereinigten Zellen wurden für 4 h mit BrefA, Ionomycin und PMA restimuliert, um die vorhandenen differenzierten Populationen im FACS zu bestimmen (B). Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und mit anti-Maus Foxp-3, IL-17, IL-4 oder IFN γ -Antikörpern (PE) sowie anti-Maus CD4-Antikörper (APC) gefärbt. Gezeigt sind repräsentativ (A) ein Dot Plot und (B) Ergebnisse einer repräsentativen Restimulation

Die aufgereinigten naiven CD4+ Zellen wurden unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen (α CD3/ α CD28 + IL-2) für 3 Tage \pm CSE stimuliert. Dann wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und für wiederum 3 Tage auf eine neue Platte, ohne α CD3, pipettiert und mit Medium + IL-2 \pm CSE wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. An Tag 3 und Tag 6 wurden mittels spezifischer intrazellulärer Marker die relative Zellzahl und die MFI der einzelnen Th Subpopulationen (Th1/ Th2/ Th17 und Treg) bestimmt. In Abb. 12 dargestellt ist die relative Zellzahl differenzierter Zellen als prozentualer Anteil des jeweiligen Th-Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der durchschnittliche prozentuale Anteil differenzierter Zellen in der Mediumkontrolle ist als Zahl über dem Balken angegeben. Dieser Wert wurde 100 % gesetzt. Die relative MFI ist ebenfalls als prozentualer Anteil im Vergleich zur Mediumkontrolle dargestellt. Nach 3 Tagen Stimulation konnte bei einem durchschnittlichen Ausgangswert von 16,6 % IFN γ + Th1 Zellen kein Anstieg der relativen Zellzahl für CSE inkubierte Zellen gesehen werden, wobei die relative MFI allerdings bei den Zellen mit 2 % CSE signifikant erhöht war, was auf eine gesteigerte Zytokinproduktion hinweist (siehe Abb. 12). Nach 6 Tagen sah man bei beiden Konzentrationen von CSE signifikant erhöhte relative Zellzahlen von IFN γ + Zellen, was für eine unterstützende und steigernde Wirkung von CSE auf die

Proliferation von Th1 Zellen spricht. Im Vergleich zur Mediumkontrolle zeigte die relative MFI für 1 % CSE allerdings einen Abfall und für 2 % CSE zeigte sich nun kein Unterschied mehr. Die IL-4+ Th2 Zellen konnten im FACS erst nach der klonalen Expansion an Tag 6 detektiert werden. Hier zeigte sich für die mit 1 % CSE behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der IL-4+ Zellen und für 2 % CSE kein Unterschied, wodurch hier kein eindeutiger Trend zu erkennen war. Aufgrund geringer Zellzahlen an beiden Analysetagen war die Ermittlung der MFI von IL-4+ und IL-17+ Zellen nicht möglich. An Tag 3 konnten im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant mehr IL-17+ Zellen detektiert werden, allerdings war der durchschnittliche Ausgangswert von 0,6 % IL-17+ Th17 Zellen hier nur sehr gering. Die relative Zellzahl steigerte sich durch die Gabe von CSE auf bis zu 3 % IL-17+ Th17 Zellen. Für die Foxp-3+ Zellen zeigten sich für Tag 3 und Tag 6 signifikante Zunahmen der relativen Zellzahlen durch die Zugabe von CSE im Vergleich zur Mediumkontrolle, wobei an Tag 6 mit 1 % CSE nur ein Trend für die Zunahme von Foxp-3+ Zellen zu sehen war. Die relative MFI war nur an Tag 3 für die Zellen mit 2 % CSE signifikant erhöht.

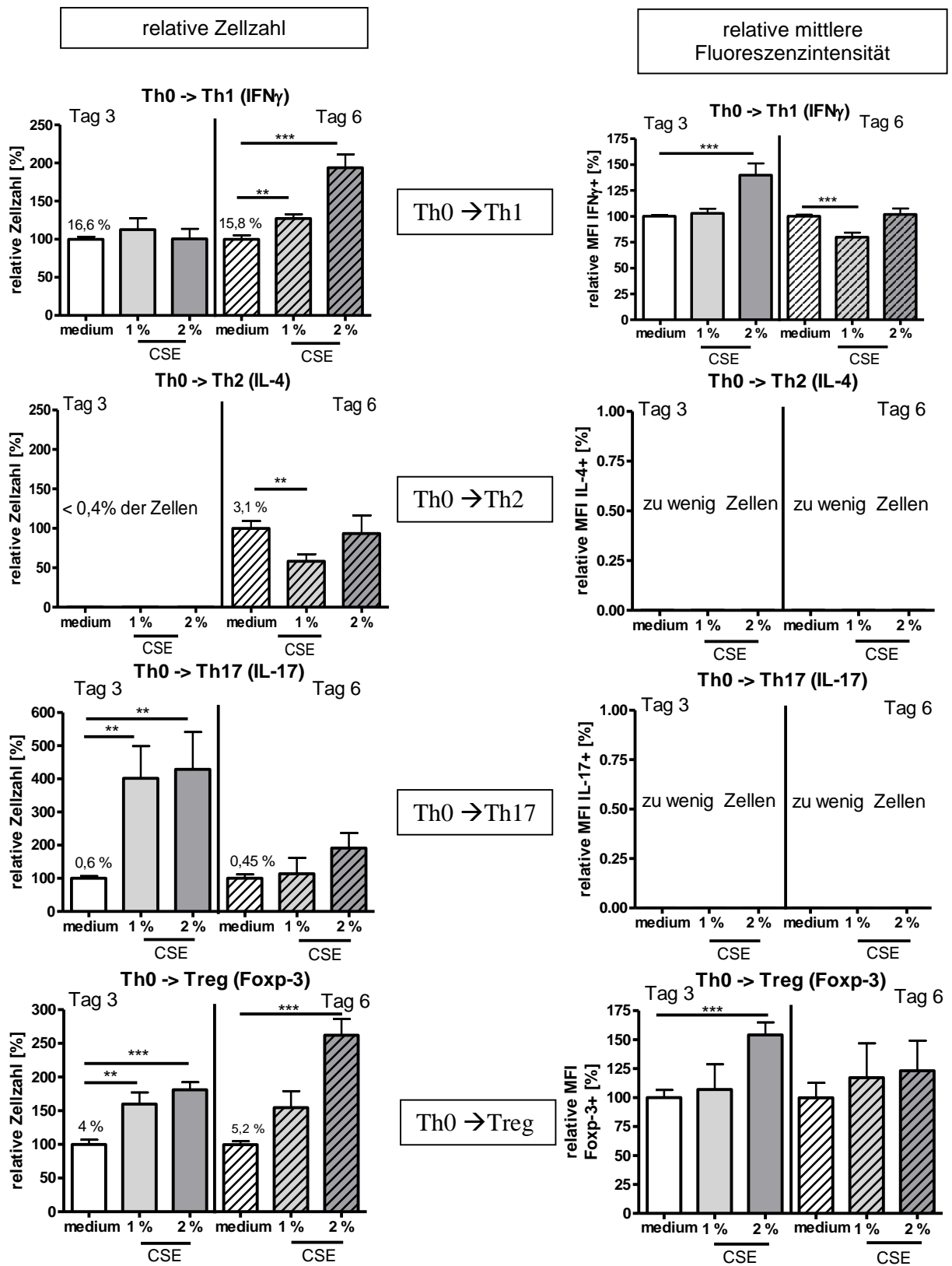


Abb. 12: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von Th0 Zellen

Beschreibung siehe nächste Seite

Abb. 12: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von Th0 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen (+ IL-2) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse der intrazellulären Marker erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA, Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die jeweiligen Marker für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind die relativen Zellzahlen (Zahl über dem Balken beschreibt den durchschnittlich prozentualen Anteil an differenzierten Zellen in der Mediumkontrolle) und die MFI des prozentualen Anteiles des jeweiligen Th Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle als Mittelwerte \pm SEM von n=3-5 Versuchsansätzen in Triplikaten, **p<0,01 und ***p<0,001

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th0 zu Th1 Zellen

CSE zeigte eine unterstützende und steigernde Wirkung auf die Expansion von IFN γ ⁺ Th1 Zellen unter nicht polarisierenden Bedingungen (siehe Abb. 12). Daher stellte sich die Frage, ob der Haupttranskriptionsfaktor von Th1 Zellen, Tbet, durch die Gabe von CSE direkt reguliert wird. Dazu wurden die Zellen wie oben erläutert kultiviert und die Zellen nach 2 Tagen Stimulation für die Analyse der mRNA entnommen. Die Proben für den Proteinnachweis von Tbet wurden erst nach 3 Tagen Stimulation und weiteren 24 h Restimulation mit α CD3 untersucht.

Mit 2 % CSE behandelte Zellen zeigten hierbei einen schwachen, aber signifikanten Anstieg der relativen Genexpression von Tbet (siehe Abb. 13). Auf der Proteinebene zeigte sich für Tbet durch CSE ein sichtbarer Rückgang (siehe Abb. 14 rote Pfeil), was im Gegensatz zu den Ergebnissen der mRNA (siehe Abb. 13) und der durchflusszytometrischen Analyse steht (siehe Abb.12).

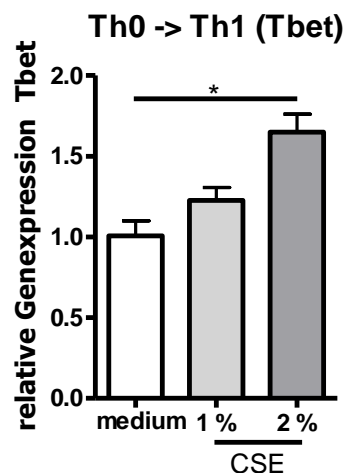


Abb. 13: Bestimmung der relativen Genexpression des Th1 Transkriptionsfaktors Tbet

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR wurde die relative Genexpression von Tbet bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des housekeeping Gens L32) n=3 Versuchsansätze, *p<0,05

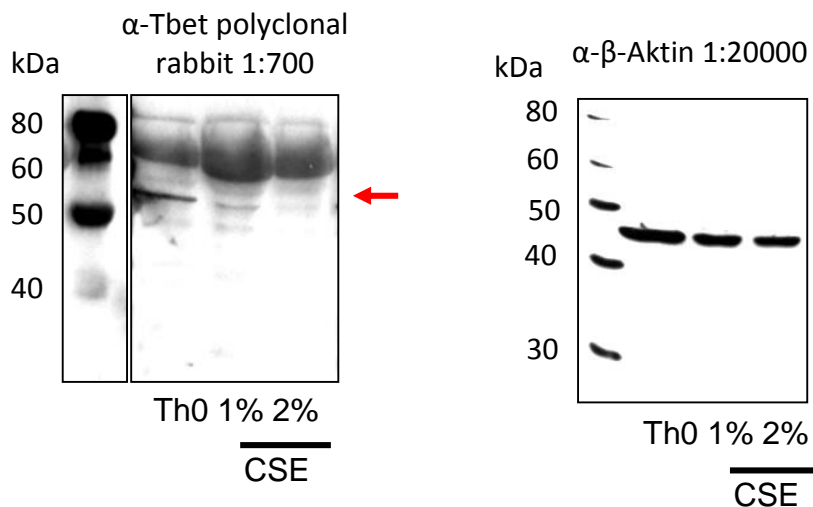


Abb. 14: Proteinnachweis für den Th1 Transkriptionsfaktor Tbet

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und für 24 h mit α CD3 restimuliert. Der WB wurde von Frau Dr. Fröbisch (Mitarbeiterin AG Garn) durchgeführt. Gezeigt ist repräsentativ links der WB für Tbet und rechts die β -Aktin Kontrolle, roter Pfeil zeigt Tbet Bande.

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th0 zu Th2 Zellen

Für die, durch das Zytokin IL-4 charakterisierten Th2 Zellen zeigte sich kein eindeutiger Trend für den Einfluss von CSE auf die Expansion dieser CD4 Subgruppe unter nicht polarisierenden Bedingungen. Dennoch wurde analog zu den Th1 Zellen nach 2 Tagen Stimulation die mRNA Expression, in diesem Fall des Th2 charakteristischen Transkriptionsfaktors GATA-3, untersucht. Die Proben für den Proteinnachweis wurden nach 3 Tagen Stimulation und weiteren 24 h Restimulation mit α CD3 analysiert.

Durch die Gabe von CSE kam es bei den mit 2 % CSE kultivierten Zellen zu einem signifikanten Rückgang der relativen Genexpression von GATA-3 (siehe Abb. 15).

Auf Proteinebene zeigte sich bei den Zellen, die mit 2 % CSE behandelt wurden, ein deutlicher Rückgang von GATA-3 im Vergleich zur Mediumkontrolle (siehe Abb. 16). Die β -Aktin Kontrolle bestätigte, dass in allen Gruppen die gleiche Menge von Protein aufgetragen wurde. Daher lässt sich die Vermutung

aufstellen, dass die Th2 Differenzierung aus Th0 Zellen durch CSE gehindert wird.

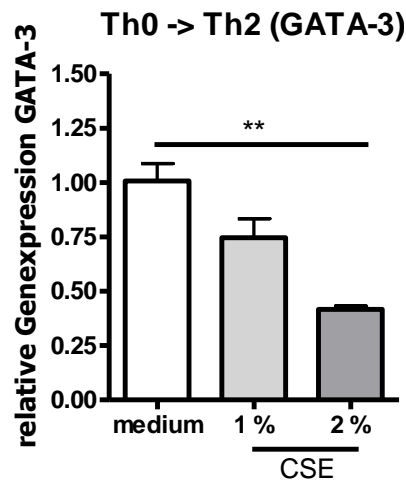


Abb. 15: Bestimmung der relativen Genexpression des Th2 Transkriptionsfaktors GATA-3

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR wurde die relative Genexpression von GATA-3 bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des housekeeping Gens L32) n=3 Versuchsansätze, **p<0,01

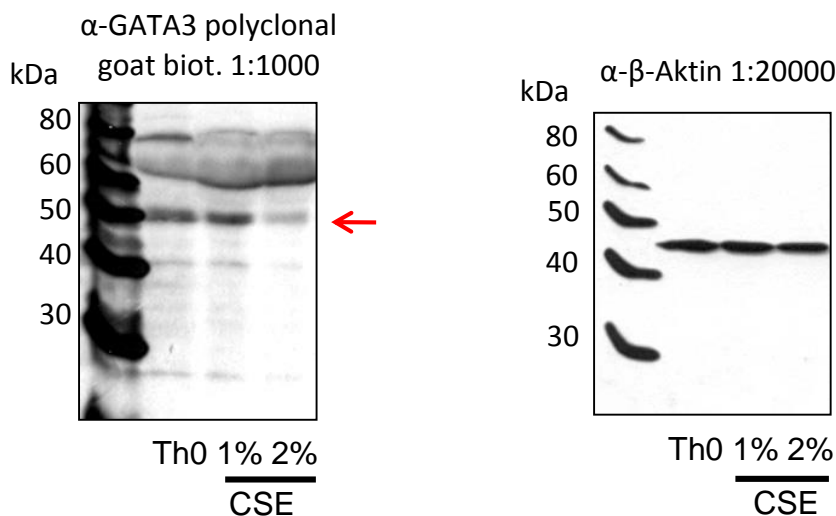


Abb. 16: Proteinnachweis für den Th2 Transkriptionsfaktor GATA-3

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und für 24 h mit α CD3 restimuliert. Der WB wurde von Frau Dr. Fröbuis (Mitarbeiterin AG Garn) durchgeführt. Gezeigt ist repräsentativ links der WB für GATA-3 und rechts die β -Aktin Kontrolle, roter Pfeil zeigt GATA-3 Bande.

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th0 zu Th17 und Treg Zellen

Die Gabe von CSE führte nach 3 Tagen Stimulation transient zu einer gesteigerten relativen Zellzahl von IL-17+ Th17 Zellen und Foxp-3+ Tregs unter nicht polarisierenden Bedingungen, die nach 6 Tagen Kultivierung bei den IL-17+ Th17 Zellen nicht mehr signifikant war und bei den Foxp-3+ Zellen nur bei den mit 2 % CSE behandelten Zellen einen signifikanten Anstieg zeigte (siehe Abb. 12). Auch hier wurde nach 2 Tagen Stimulation die mRNA-Expression der Subtyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren ROR γ t und Foxp-3 untersucht.

Die relative Genexpression des Th17 spezifischen Transkriptionsfaktors ROR γ t zeigte einen Trend für eine erhöhte Expression durch CSE und die relative Genexpression des Treg spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp-3 konnte mit 2 % CSE signifikant gesteigert werden (siehe Abb. 17). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten der intrazellulären Expression (siehe Abb. 12).

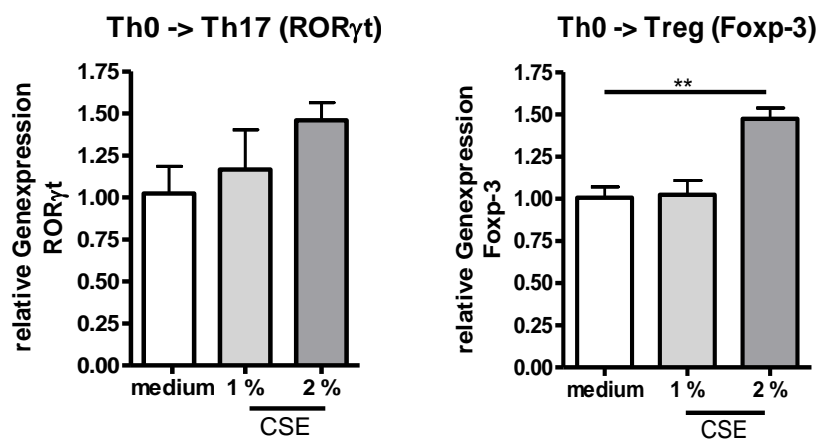


Abb. 17: Bestimmung der relativen Genexpression der Transkriptionsfaktoren ROR γ t und Foxp-3

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR wurde die relative Genexpression von ROR γ t und Foxp-3 bestimmt.

Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des *housekeeping* Gens L32) n=3 Versuchsansätze, **p<0,01

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CSE unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen die Expansion von Th1 Zellen unterstützt, da eine erhöhte IFN γ + Th1 Population und eine erhöhte Tbet Genexpression gezeigt werden konnte, wobei sich auf der Proteinebene ein Rückgang von Tbet zeigte. Im Gegensatz dazu wird die Expansion der Th2 Zellen vermindert, nachgewiesen durch die Reduktion der GATA-3 Expression auf mRNA und

Proteinebene. Für die Expansion der Th17 Zellen war eine leichte Unterstützung, auf einem niedrigen Niveau, zu erkennen. Auf die Expansion von regulatorischen T-Zellen wirkte CSE ebenfalls fördernd.

3.1.3 Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von hoch aufgereinigten naïven CD4⁺ Zellen

In den Untersuchungen zur potentiellen Induktion einer T-Zelldifferenzierung durch CSE-Medium wurde gezeigt, dass CSE eine unterstützende und steigernde Wirkung auf die Expansion von IFN γ ⁺ Th1 Zellen unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen hat. Da mit der dafür verwendeten Standard-Aufreinigung von Zellen ca 20 % der Zellen (siehe Abb. 11B) bereits Differenzierungsmerkmale für verschiedene T-Zell-Subpopulationen aufwiesen, war unklar, ob der beobachtete Einfluss auf die Differenzierung von Th1 Zellen möglicherweise nur auf den Einfluss der Expansion bereits vordifferenzierter Zellen zurückzuführen ist. Um dies zu klären, wurde ein Versuch mit hoch aufgereinigten naïven CD4⁺ Zellen durchgeführt.

Die CD4⁺ Zellen wurden aus den Milzen von C57Bl/6 Mäusen isoliert und mittels FACS-Sort mit den Oberflächenmarkern für naïve CD4 Zellen (CD4-APC und CD62L-PE) mit einer Reinheit von 99,1 % isoliert (siehe Abb. 18).

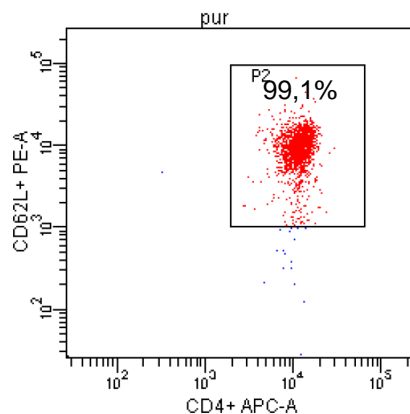


Abb. 18: Reinheit von hoch aufgereinigten naïven CD4⁺ Zellen

Aufgereinigte naïve CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden im FACS-Sort isoliert und für die Effizienzbestimmung der Reinheit mit anti-Maus CD4 (APC) und anti-Maus CD62L (PE) gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentativer Dot Plot.

Diese Zellen wurden dann unter nicht differenzierenden (Th0) Bedingungen (α CD3/ α CD28 + IL-2) für 3 Tage \pm CSE stimuliert. Anschließend wurden die

Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wiederum 3 Tage auf eine neue Platte (ohne α CD3) pipettiert und mit Medium + IL-2 \pm CSE auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. An Tag 3 und Tag 6 wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, die intrazellulären Marker für die unterschiedlichen Th Subgruppen untersucht. Nach 3 Tagen Stimulation konnten für alle Marker noch keine positiven Zellen detektiert werden. Außerdem konnten nach 6 Tagen nur für IFN γ und Foxp-3 positive Zellen ermittelt werden, wobei IL-4+ und IL-17+ Zellen nach wie vor nicht zu detektieren waren.

Die IFN γ + Th1 Zellen zeigten mit 2 % CSE einen signifikanten Anstieg in der relativen Zellzahl, wobei die Zunahme der absoluten Werte von 8,2 % auf 10,2% sehr gering war (siehe Abb. 19). In der relativen MFI zeigte sich währenddessen kein Unterschied zur Mediumkontrolle. Für Foxp-3+ Zellen konnte durch die Gabe von CSE kein Unterschied zur Mediumkontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 19).

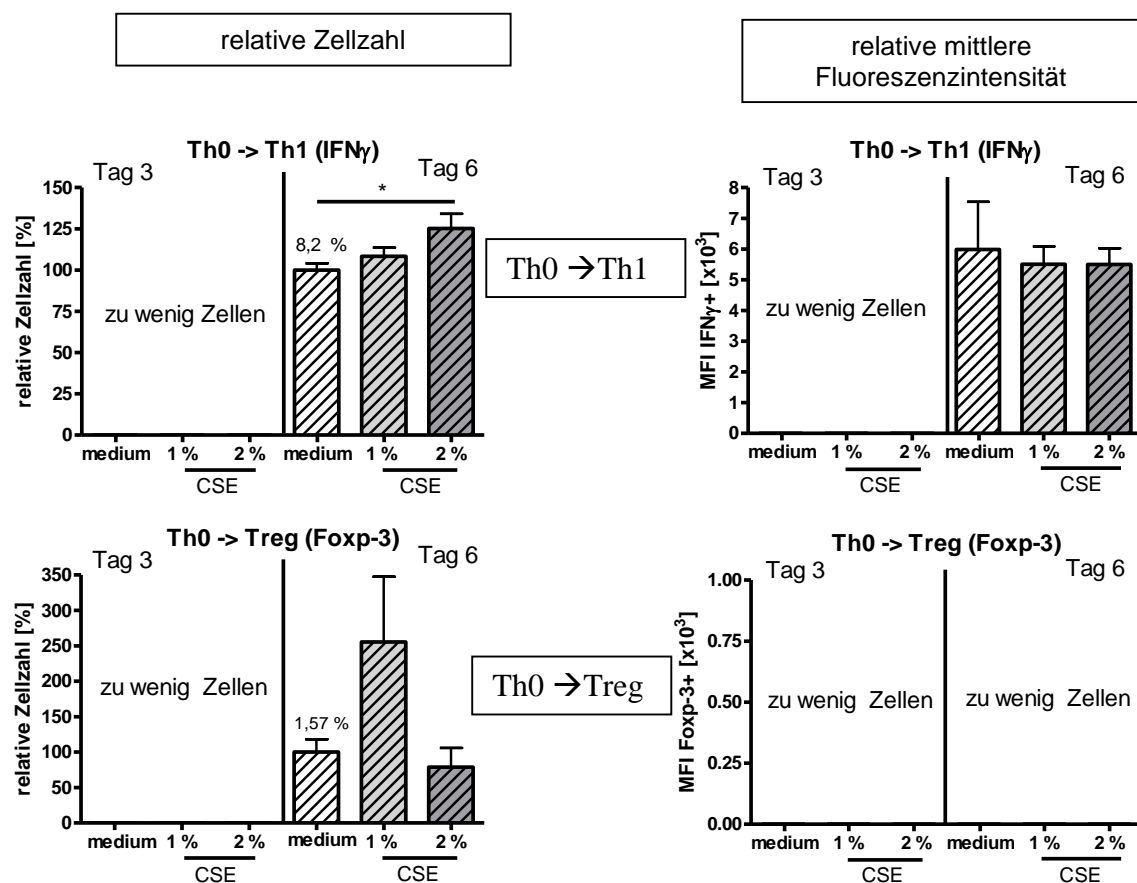


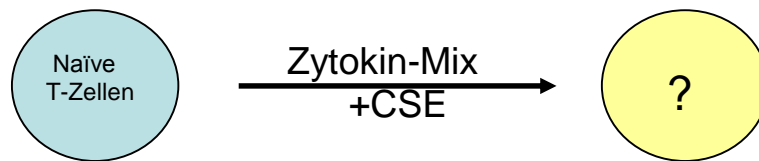
Abb. 19: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von hoch reinen Th0 Zellen
Beschreibung siehe nächste Seite

Abb. 19: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von hoch reinen Th0 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mittels FACS Sort isoliert und unter Th0 Bedingungen (+ IL-2) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse der intrazellulären Marker erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die jeweiligen Marker für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind die relativen Zellzahlen des prozentualen Anteiles des jeweiligen Th Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle und MFI als Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen *p<0,05

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CSE per se keinen Einfluss auf die Differenzierung von naiven CD4⁺ Zellen hat. Die Unterschiede, die in 3.1.2 zu sehen waren, sind daher nur durch das Vorhandensein der schon differenzierten Zellen bedingt und beschreiben somit den Einfluss von CSE auf schon differenzierte Zellen *ex vivo*. Welchen Einfluss CSE auf die Differenzierung der einzelnen Th Subpopulationen hat, wird unter 3.1.4 beschrieben und wie CSE schon differenzierte Th Subpopulationen beeinflusst, beschreibt Abschnitt 3.1.5.

3.1.4 Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von Th1/ Th2/ Th9/ Th17 und Tregs



Um zu untersuchen, welchen Einfluss CSE auf die Differenzierung der einzelnen Th Subpopulationen hat, wurden naïve CD4⁺ Zellen wie in 3.1.2 beschrieben isoliert und für 3 Tage mit α CD3 + α CD28 und ihrem spezifischen Zytokin-Mix (siehe Abschnitt 2.2.3.3) \pm CSE polarisiert. Danach wurden die Zellen für die klonale Expansion geteilt und die Hälfte der Zellsuspension eines Wells auf eine neue Platte ohne α CD3 umgesetzt und wieder mit frischem Medium + IL-2 \pm CSE auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und für weitere 3 Tage kultiviert. An Tag 3 und Tag 6 wurden mittels T-Zellsubtyp-spezifischer intrazellulärer Marker die relative Zellzahl und MFI der einzelnen Th Subpopulationen (Th1/ Th2/ Th17 und Treg) bestimmt. In Abb. 20 dargestellt ist die relative Zellzahl differenzierter Zellen als prozentualer Anteil des jeweiligen Th-Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der durchschnittliche prozentuale Anteil differenzierter Zellen in der Mediumkontrolle ist als Zahl über dem Balken angegeben. Dieser Wert wurde 100 % gesetzt. Die relative MFI ist ebenfalls als prozentualer Anteil im Vergleich zur Mediumkontrolle dargestellt. Nach 3 Tagen führte CSE zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von IFN γ ⁺ Th1 Zellen, aber gleichzeitig zu einer verstärkten Polarisation mit erhöhter relativer MFI. Bei einem Ausgangswert von 100 % (43,7 % IFN γ ⁺ Zellen relativ zur Gesamtpopulation) wurden relativ gesehen durch CSE 20 – 25 % weniger IFN γ ⁺ Zellen polarisiert (35 % IFN γ ⁺ Zellen relativ zur Gesamtpopulation). Allerdings steigerten die Gruppen mit CSE während der klonalen Expansion ihre Proliferation zu IFN γ ⁺ Th1 Zellen drastisch wodurch die initiale Verzögerung über die Zeit wieder aufgehoben wurde. Die relative MFI wies an beiden Analysetagen für 1 und 2 % CSE signifikant erhöhte Intensitäten auf, die an Tag 3 bei 2 % CSE bis auf 248 % anstieg (siehe Abb. 20 Th1). IL-4 konnte als intrazellulärer Marker für Th2 Zellen erst nach 6 Tagen Kultivierung detektiert werden. Es zeigten sich allerdings sowohl in der relativen Zellzahl als

auch für die relative MFI keine Unterschiede für die mit CSE differenzierten Th2 Zellen (siehe Abb. 20 Th2). Für IL-17+ Th17 Zellen konnte nach 3 Tagen kein Unterschied in der relativen Zellzahl ermittelt werden, dagegen zeigte sich eine CSE-abhängige Steigerung der relativen MFI an Tag 3 auf 153 %. Doch nach 6 Tagen mit CSE wurden signifikant weniger IL-17+ Zellen detektiert, wobei die Th17 Zellen ihr Differenzierungsmaximum mit durchschnittlich 26,5 % in der Mediumkontrolle schon an Tag 3 zeigten. Auch die relative MFI war nach 6 Tagen Differenzierung für IL-17+ Th17 Zellen durch CSE auf bis zu 72 % signifikant reduziert (siehe Abb. 20 Th17).

Die regulatorischen T-Zellen zeigten nach 3 Tagen Polarisierung durch CSE eine signifikante Hemmung von bis zu 50 % in der Differenzierung von Foxp-3+ Zellen. Allerdings zeigten diese Foxp-3+ Zellen nach 3 Tagen Differenzierung eine erhöhte relative MFI, was auf eine erhöhte Aktivität dieser Zellen spricht. Die Tregs zeigten schon nach 3 Tagen Polarisierung mit durchschnittlich 67 % Foxp-3+ Zellen ihr Differenzierungsmaximum. Nach der klonalen Expansion an Tag 6 konnte für Zellen mit 1 % CSE ein signifikant größerer Rückgang der relativen Zellzahl von Foxp-3+ Zellen ermittelt werden, aber bei 2 % CSE konnte kein Unterschied beobachtet werden. Die relative MFI für Foxp-3+ Zellen wurde an Tag 6 durch CSE nicht mehr beeinflusst (siehe Abb. 20 Treg).

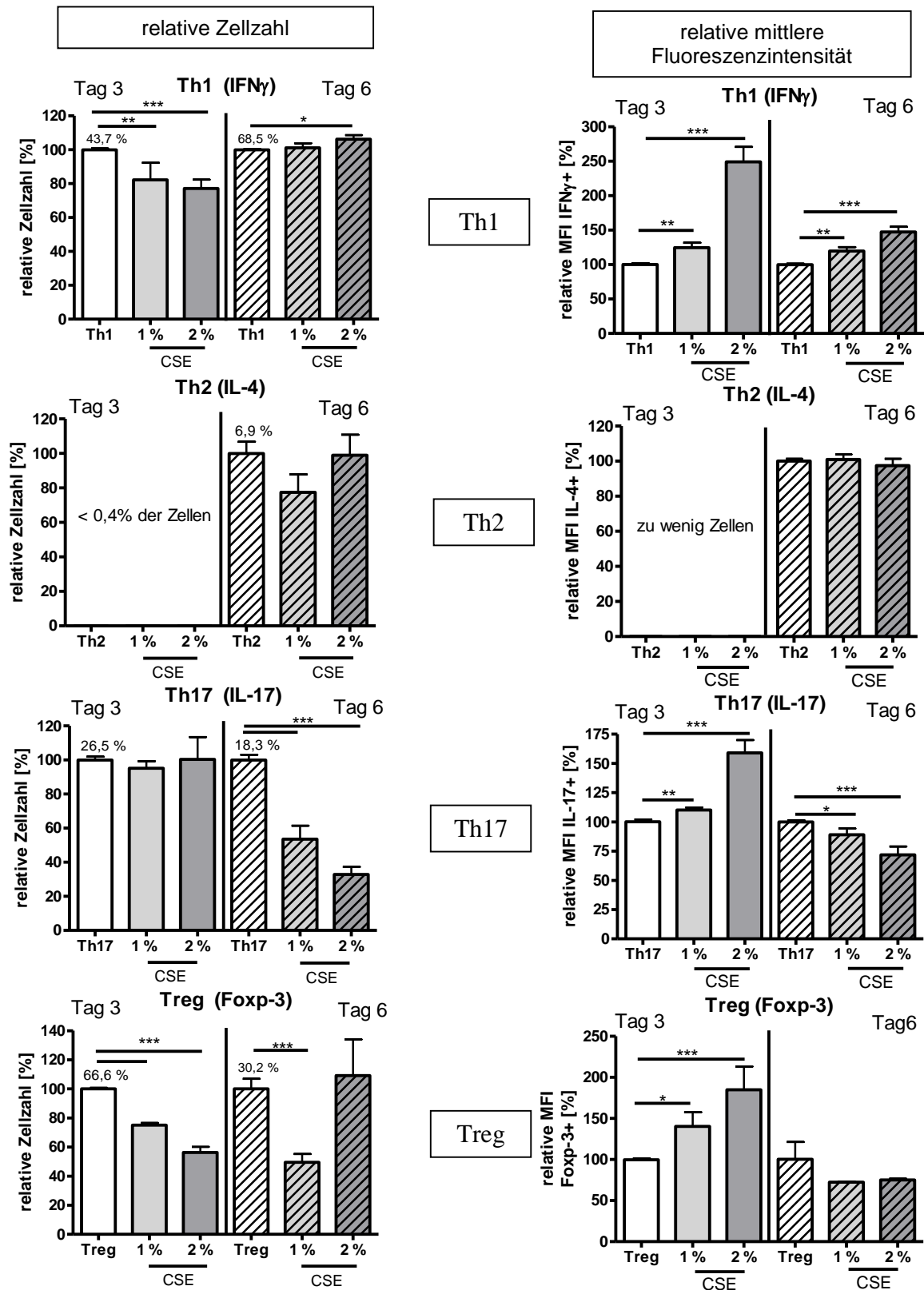


Abb. 20: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von verschiedenen Th Subtypen
Beschreibung siehe nächste Seite

Abb. 20: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von verschiedenen Th Subtypen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische-Zytokin-Mix für Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium + IL-2 \pm CSE aufgefüllt. Die Analyse der intrazellulären Marker erfolgte mittels FACS jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit Ionomycin und PMA + BrefA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA und Färbung für die jeweiligen Marker. Gezeigt sind die relativen Zellzahlen (Zahl über den Balken beschreibt den durchschnittlich prozentualen Anteil differenzierter Zellen in der Mediumkontrolle) und die MFI des prozentualen Anteiles des jeweiligen Th Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle als Mittelwerte \pm SEM von n=3-5 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

Die Spezifität der gewählten intrazellulären Marker für die jeweiligen Th Subtypen wurde anhand aller Th Subtypen untersucht (siehe Anhang Abb. S8 – Abb. S11). Die jeweiligen Marker wurden ausschließlich in den jeweilig assoziierten Th Subtypen oder der mit Th0 gekennzeichneten nicht polarisierten Population nachgewiesen, wobei letzteres auf bereits differenzierte Zellen in der Zellpopulation (~ 20 %) nach der Aufreinigung zurückzuführen ist (siehe Abb. 11B).

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th1 Zellen

CSE verzögert anscheinend die Proliferation von IFN γ ⁺ Zellen, wobei bei diesen Zellen anhand der erhöhten MFI auf eine verstärkte Differenzierung geschlossen werden kann und somit diese Zellen produktiver zu sein scheinen (siehe Abb. 20).

Nach 2 Tagen Th1 Polarisation \pm CSE wurde die mRNA auf die Expression von Tbet untersucht.

Zu diesem Zeitpunkt der Probennahme konnte kein CSE-vermittelter Unterschied in der Tbet-Genexpression ermittelt werden (siehe Abb. 21). Auf Proteinebene zeigte sich nach 3 Tagen Polarisation und 24 h α CD3 Restimulation ein sichtbarer Rückgang an Tbet (siehe Abb. 22). Die β -Aktin Banden bestätigen, dass eine einheitliche Proteinmenge verwendet wurde.

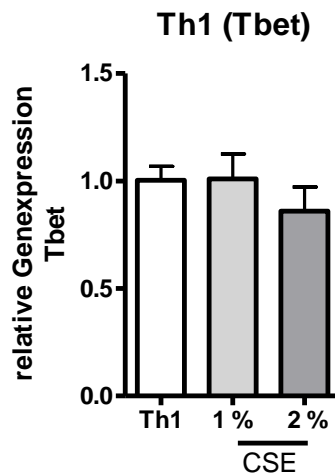


Abb. 21: Bestimmung der relativen Genexpression des Th1 Transkriptionsfaktors Tbet

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th1 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR wurde die relative Genexpression von Tbet bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des housekeeping Gens L32) n=3 Versuchsansätze.

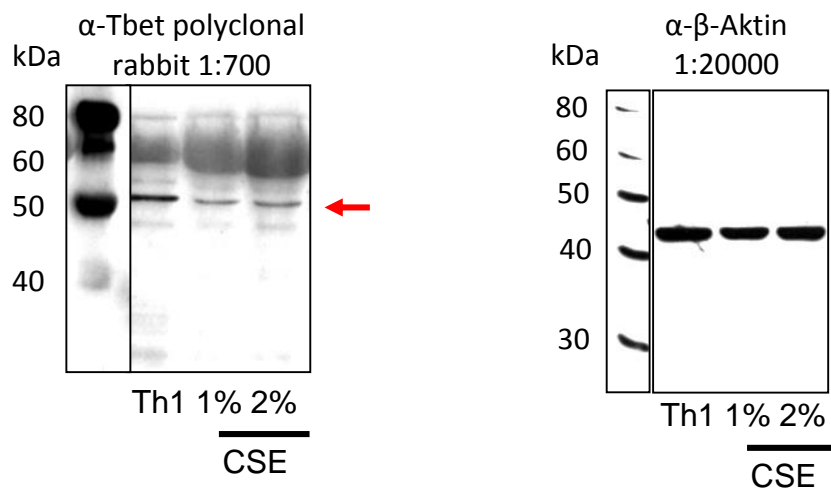


Abb. 22: Proteinnachweis für den Th1 Transkriptionsfaktor Tbet

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th1 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 +IL-2 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und für 24 h mit α CD3 restimuliert. Der WB wurde von Frau Dr. Fröbuis (Mitarbeiterin AG Garn) durchgeführt. Gezeigt ist repräsentativ links der WB für Tbet und rechts die β -Aktin Kontrolle, roter Pfeil zeigt Tbet Bande.

Weiterhin wurden naive CD4⁺ Zellen mit den jeweiligen Zytokin-Mixen zu allen Th Subtypen polarisiert und nach 3 Tagen wurden 500.000 Zellen je Th Subtyp für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert und die Überstände auf die Th1 spezifische IFN γ Produktion untersucht und der Effekt von CSE bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass $\text{IFN}\gamma$ spezifisch von den restimulierten Th1 polarisierten Zellen gebildet wurde (siehe Abb. 23A). Die anderen Th Subpopulationen produzierten nur eine geringe Menge an $\text{IFN}\gamma$, welches ungefähr dem Level von den nicht restimulierten Th1 Zellen entsprach. Diese $\text{IFN}\gamma$ Sekretion in diesen Th Subtypen wurde wahrscheinlich von der nach der Aufreinigung vorhandenen Th1 Population gebildet. Durch die Gabe von CSE wurde die niedrige Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in allen Th Subtypen signifikant gehemmt (siehe Abb. 23). Auch für die nach der Aufreinigung verbliebenen und unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen stimulierten Th1 Zellen zeigte sich durch CSE ein signifikanter Rückgang an der gebildeten Menge von $\text{IFN}\gamma$ (siehe Anhang Abb. S6). Da die Werte für die restimulierten Th1 Zellen in allen drei Gruppen weit über dem Detektionslimit von 2500 pg/ mL lagen, konnte trotz entsprechender Verdünnung kein Unterschied in der $\text{IFN}\gamma$ Produktion durch CSE Behandlung nachgewiesen werden. Daher wurden Th1 differenzierte Zellen in zwei weiteren Testsystemen hinsichtlich $\text{IFN}\gamma$ Produktion untersucht. Diese Tests ergaben, dass Th1 polarisierte Zellen, die mit CSE behandelt wurden, im Vergleich zur Mediumkontrolle einen signifikant höheren Anteil (20 – 30%) $\text{IFN}\gamma$ sekretierender Zellen aufwiesen (siehe Abb. 23B) und auch signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$ produzierten (siehe Abb. 23C). Th1 polarisierte Zellen ohne CSE produzierten im Durchschnitt 405 ng/mL $\text{IFN}\gamma$, während durch CSE die Produktion auf im Durchschnitt 890 ng/mL mehr als verdoppelt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass sich durch CSE anfangs zwar weniger Th1 Zellen entwickeln, diese aber produktiver sind und deutlich mehr $\text{IFN}\gamma$ sekretieren. Dieser Effekt des Zigarettenrauchs könnte auch für die verstärkten Entzündungsreaktionen bei COPD Patienten verantwortlich sein.

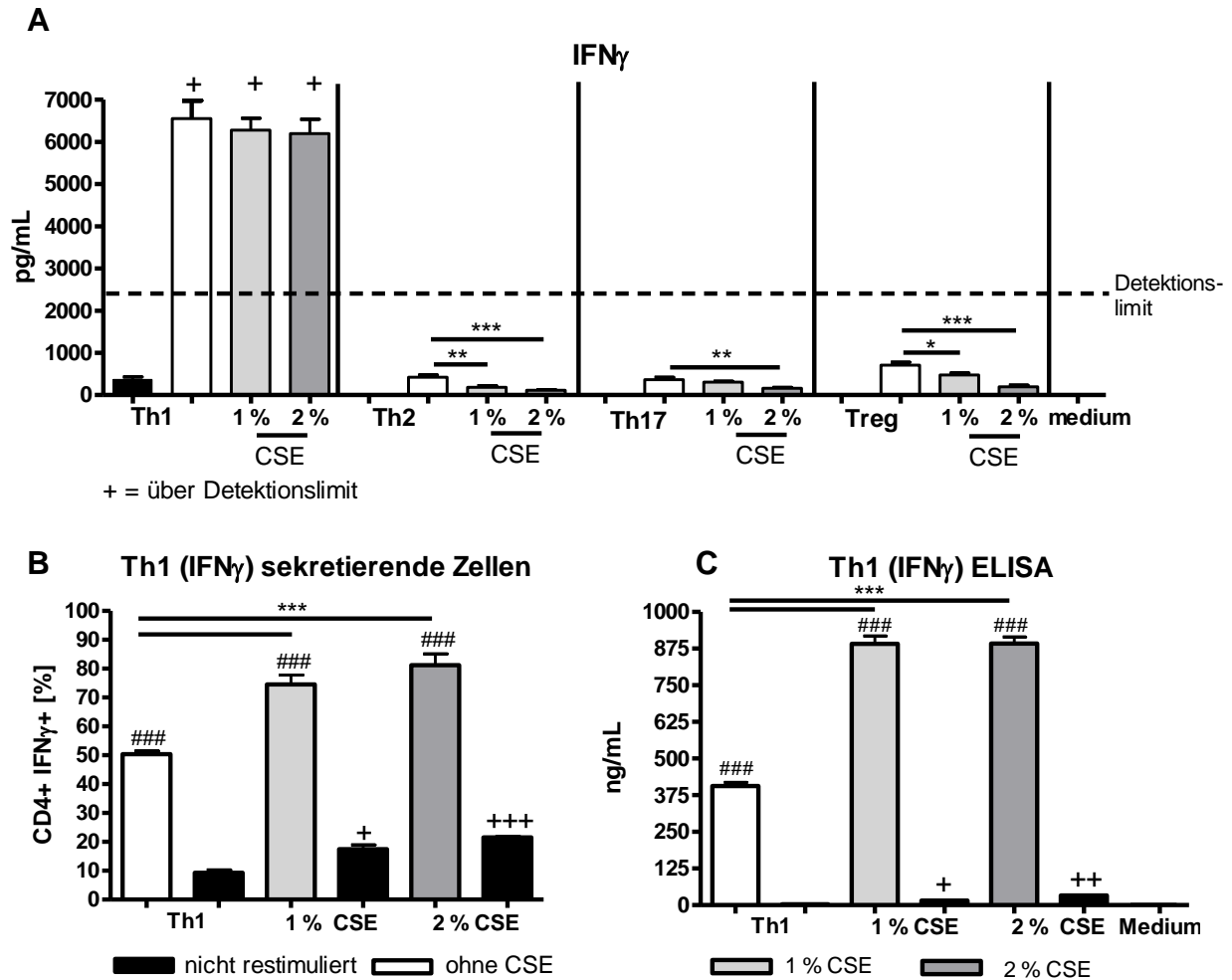


Abb. 23: Einfluss von CSE-Medium auf die IFN γ Produktion während der Differenzierung von verschiedenen Th Subtypen

Aufgereinigte naive CD4 $^{+}$ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische-Zytokin-Mix für Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand aller Subtypen wurde mittels CBA (A) analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001. Die relative Anzahl IFN γ -freisetzender Th1 Zellen wurden außerdem im FACS ermittelt (B) und IFN γ im Überstand mittels ELISA (C) gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n= 3 Versuchsansätzen, ***p<0,001 zur Kontrolle, ###p<0,001 zur nicht restimulierten Gruppe und +p<0,05, ++p<0,01 und +++p<0,001 zur nicht restimulierten Kontrolle

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th2 Zellen

Durch CSE scheint die Th2 Differenzierung zumindest an Tag 6 in Hinsicht auf die intrazelluläre IL-4 Expression nicht beeinflusst zu sein (siehe Abb. 20). Um näher die sekretierten Marker-Zytokine für Th2 Zellen zu untersuchen, wurden naive CD4⁺ Zellen mit dem jeweiligen Zytokin-Mix \pm CSE für 3 Tage in alle Th Subtypen polarisiert. Je 500.000 Zellen wurden für 24 h mit α CD3 restimuliert und die Spiegel der spezifischen Th2 Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) im Überstand aller Th Subtypen untersucht.

Erwartungsgemäß wurden die Th2 assoziierten Zytokine hauptsächlich von den Th2 polarisierten Zellen gebildet. Die IL-4 Sekretion wurde in Th2 Zellen durch 2 % CSE signifikant inhibiert. Auch die IL-5 Sekretion der Th2 Zellen wurde durch CSE deutlich dosisabhängig inhibiert, da die sekretierte Menge IL-5 von durchschnittlich 434 pg/mL auf 37 pg/mL bei 1 % CSE und bei 2 % CSE unter das Detektionslimit von 2,5 pg/mL gefallen war. Diese CSE-dosisabhängige Inhibition wurde bei den Th2 Zellen auch für die IL-13 Sekretion festgestellt (siehe Abb. 24). Bei den Th17 Zellen führte die niedrige Konzentration von 1 % CSE zu einem Anstieg der sekretierten Menge IL-4. IL-5 wurde von den Th17 Zellen erwartungsgemäß nicht sekretiert und die geringe sekretierte Menge IL-13 zeigte durch die Wirkung von CSE nur einen leichten Rückgang (siehe Abb. 24). Auch bei den Tregs zeigte sich durch CSE bei einer niedrigen Ausgangsmenge von IL-4 und IL-13 nur ein leichter Rückgang der sekretierten Menge an Zytokin (siehe Abb. 24). Die Th1 Zellen sekretierten weder IL-4 noch IL-5 und nur eine geringe Menge an IL-13, welche durch den Einfluss von CSE noch vermindert wurde (siehe Abb. 24).

Diese inhibierende Wirkung auf die Produktion der Th2 Zytokine korreliert mit den Ergebnissen, die schon bei den Th2 Zellen, die unter Th0 Bedingungen kultiviert und CSE ausgesetzt wurden, gezeigt werden konnte (siehe Anhang Abb. S6).

Der Th2 spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 zeigte auf mRNA Expression nach 2 Tagen Polarisation keine Unterschiede durch CSE (siehe Abb. 25). Allerdings konnte auf Proteinebene nach 3 Tagen Polarisation und 24 h α CD3 Restimulation eine leichte Abnahme von GATA-3 durch 2 % CSE gezeigt werden (siehe Abb. 26). Die β -Aktin Kontrolle zeigt eine etwas geringeren

Probenauftrag für 2 % CSE etwas weniger Protein aufgetragen wurde, allerdings erklärt das nicht die deutlich schwächere Bande bei GATA-3.

Somit wurde gezeigt, dass CSE mit steigender Konzentration einen inhibierenden Einfluss auf die GATA-3 Proteinexpression hat in dessen Folge auch die Produktion der Th2 spezifischen Zytokine beeinflusst ist.

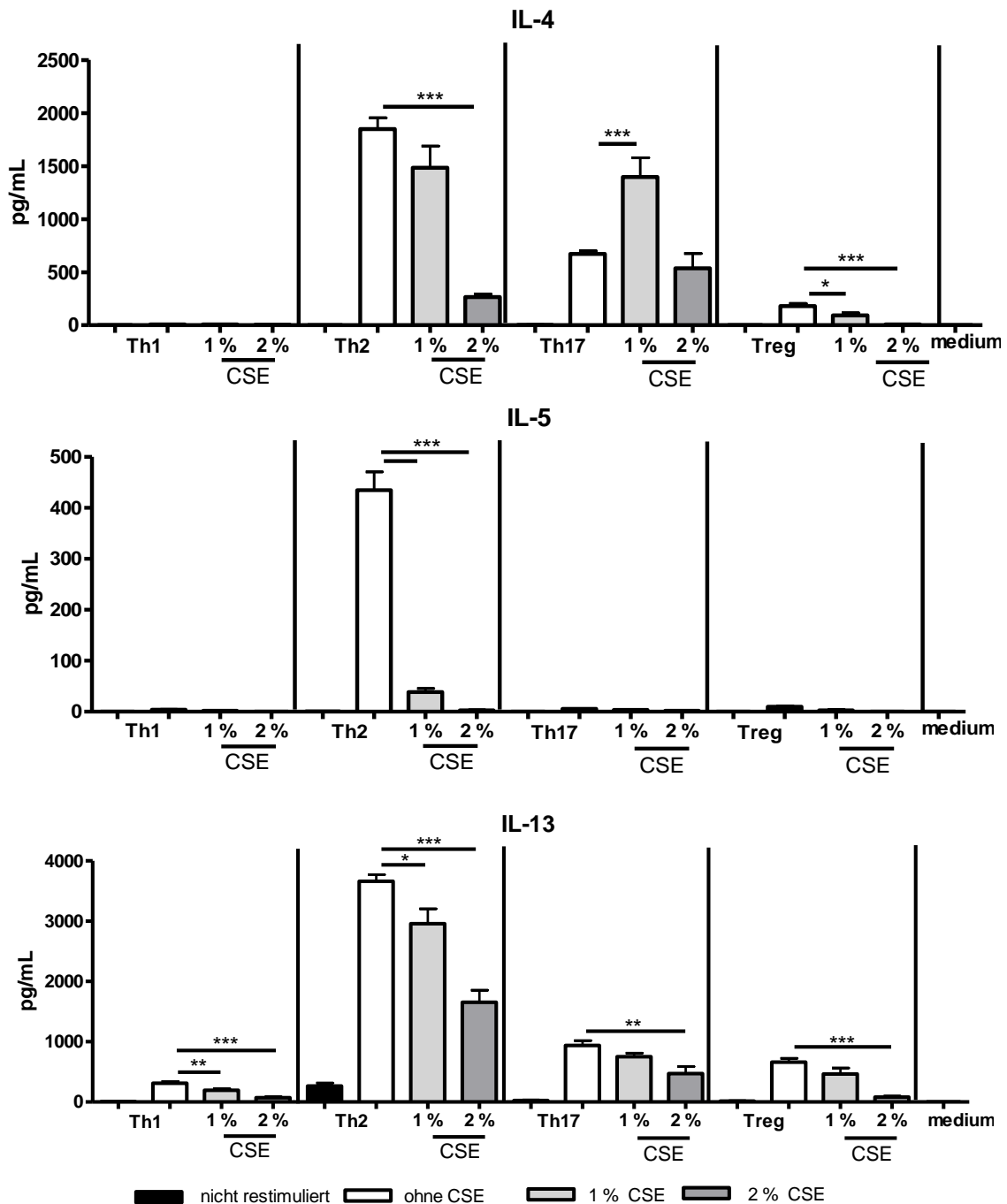


Abb. 24: Einfluss von CSE-Medium auf die Sekretion Th2 spezifischer Zytokine

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische Zytokin-Mix für Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

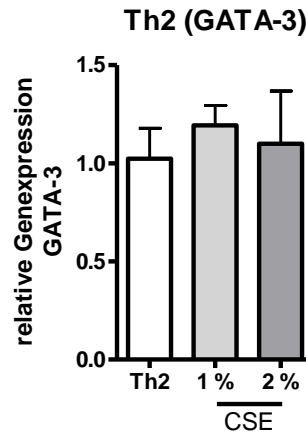


Abb. 25: Bestimmung der relativen Genexpression des Th2 Transkriptionsfaktors GATA-3

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR wurde die rel. Genexpression von GATA-3 bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des housekeeping Gens L32) n=3 Versuchsansätze in Triplikaten

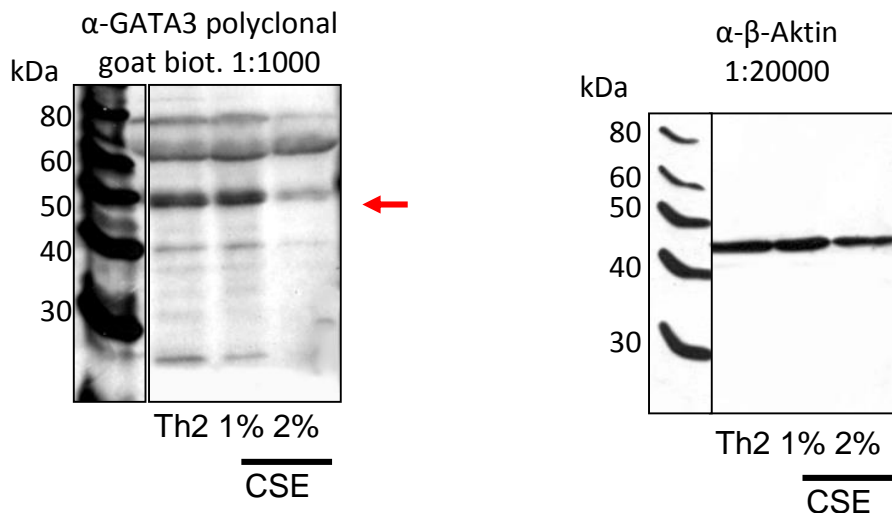


Abb. 26: Proteinnachweis für den Th2 Transkriptionsfaktor GATA-3

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und für 24 h mit α CD3 restimuliert. Der WB wurde von Frau Dr. Fröbuis (Mitarbeiterin AG Garn) durchgeführt. Gezeigt ist repräsentativ links der WB für GATA-3 und rechts die β -Aktin Kontrolle, roter Pfeil zeigt GATA-3 Bande.

Einfluss von CSE auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen

Nachdem gezeigt wurde, dass CSE einen inhibierenden Effekt auf die Sekretion der Th2 assoziierten Zytokine während der Differenzierung von Th2 Zellen parallel aber einen steigernden Effekt auf die Sekretion von IFN γ der Th1 Zellen hat, stellte sich die Frage, ob auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Th Subgruppen von CSE beeinflusst wird.

Dazu wurden naïve CD4+ Zellen mit dem jeweiligen spezifischen Zytokin-Mix \pm CSE in verschiedene Th Subpopulationen polarisiert. Nach 3 Tagen Polarisation wurden jeweils 500.000 Zellen für 24 h α CD3 restimuliert und die Menge an den gebildeten proinflammatorischen Zytokinen im Überstand aller Th Subtypen gemessen und die Effekte von CSE bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass IL-6 vorzugsweise von Th2 Zellen (33 pg/ml) gebildet wurde und konzentrationsabhängig durch CSE (10 pg/mL) inhibiert wurde (siehe Abb. 27). Auch bei allen anderen Th Subpopulationen zeigte sich eine inhibierende Wirkung von CSE auf die IL-6 Produktion. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls bei den Zellen, die unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen \pm CSE kultiviert wurden, bestätigt werden (siehe Anhang Abb. S6).

TNF α wird von allen Th Subpopulationen gebildet, wobei die Th1 Zellen mit 2000 pg/mL die stärkere Freisetzung zeigte. Diese Sekretion wurde durch CSE konzentrationsabhängig signifikant gehemmt (siehe Abb. 27). Bei Th2 und Treg polarisierten Zellen führte eine Konzentration von 2 % CSE zu verminderten Spiegeln an TNF α . Nur für Th17 polarisierte Zellen konnte eine leicht verstärkte Produktion von TNF α unter CSE-Einfluss gezeigt werden (siehe Abb. 27). Bei den Zellen, die unter Th0 Bedingungen kultiviert wurden, konnte durch CSE ebenfalls ein signifikanter Rückgang der produzierten Menge von IL-6 und TNF α analysiert werden (siehe Anhang Abb. S6).

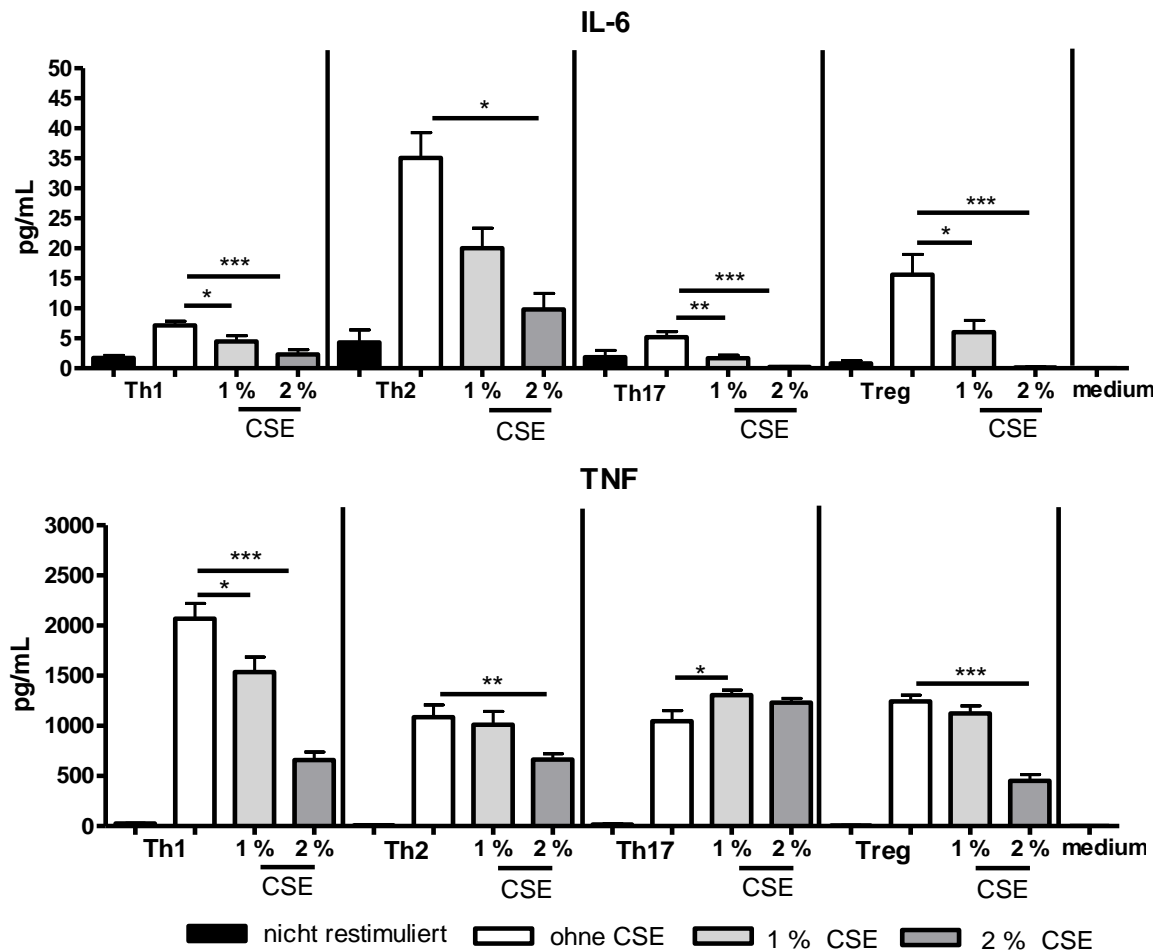


Abb. 27: Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische-Zytokin-Mix für Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CSE die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α konzentrationsabhängig in Th1, Th2 und Tregs inhibiert. Im Gegensatz dazu wird die gebildete Menge an TNF α in Th17 Zellen durch den Einfluss von CSE nur unbedeutend beeinflusst.

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th17 Zellen

Die Frequenz von Th17 Zellen zeigte nach 3 Tagen Polarisation keinen Unterschied durch die Zugabe von CSE, allerdings wurden höhere relative MFI beobachtet, was für produktivere Zellen sprechen könnte (siehe Abb. 20).

Im Folgenden wurde der Effekt von CSE auf die Differenzierung der Th17 Zellen und auf die Freisetzung der Th17 spezifischen Zytokine näher untersucht. Dafür wurden naïve CD4⁺ Zellen mit dem jeweiligen spezifischen Zytokin-Mix ± CSE in verschiedene Th Subpopulationen polarisiert. Nach 3 Tagen Polarisation wurden je 500.000 Zellen für 24 h mit α CD3 restimuliert und die Menge an den Th17 spezifischen Zytokinen, IL-21 und IL-17, im Überstand aller Th Subtypen gemessen.

Beide Zytokine (IL-21 und IL-17A) wurden spezifisch von den Th17 polarisierten Zellen gebildet. Es zeigte sich für IL-21 und IL-17A durch CSE kein signifikanter Unterschied in der sekretierten Menge im Vergleich zur Mediumkontrolle (siehe Abb. 28A). Die anderen Th Subpopulationen produzierten nur geringe Mengen an IL-17A und IL-21. Für die nach der Aufreinigung verbliebenen und unter Th0 Bedingungen stimulierten Th17 Zellen zeigte sich durch CSE ein Rückgang an der sehr gering gebildeten Menge von IL-17A und IL-21 (siehe Anhang Abb. S6).

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob durch CSE mehr IL-17A sekretierende Zellen gebildet werden, oder ob differenzierte Zellen mehr IL-17A bilden. Durch den Einfluss von CSE konnte nur eine leichte, nicht signifikante Abnahme der relativen Anzahl IL-17A sekretierender Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 28B). Der Th17 spezifische Transkriptionsfaktor ROR γ t wurde nach 2 Tagen Polarisation untersucht. CSE hatte keinen Einfluss auf die Expression von ROR γ t.

Dieses Ergebnis bestätigt das mittels intrazellulärer Marker ermittelte Ergebnis (siehe Abb. 20), dass CSE die Differenzierung von Th17 Zellen in den ersten 3 Tagen nicht beeinflusst, da auch die Produktion von IL-17A und TNF α nicht bedeutend beeinflusst wurde (siehe Abb. 27 und Abb. 28). Allerdings waren nach der klonalen Expansion an Tag 6 CSE vermittelt signifikant weniger IL-17A⁺ Effektorzellen vorhanden (siehe Abb. 20).

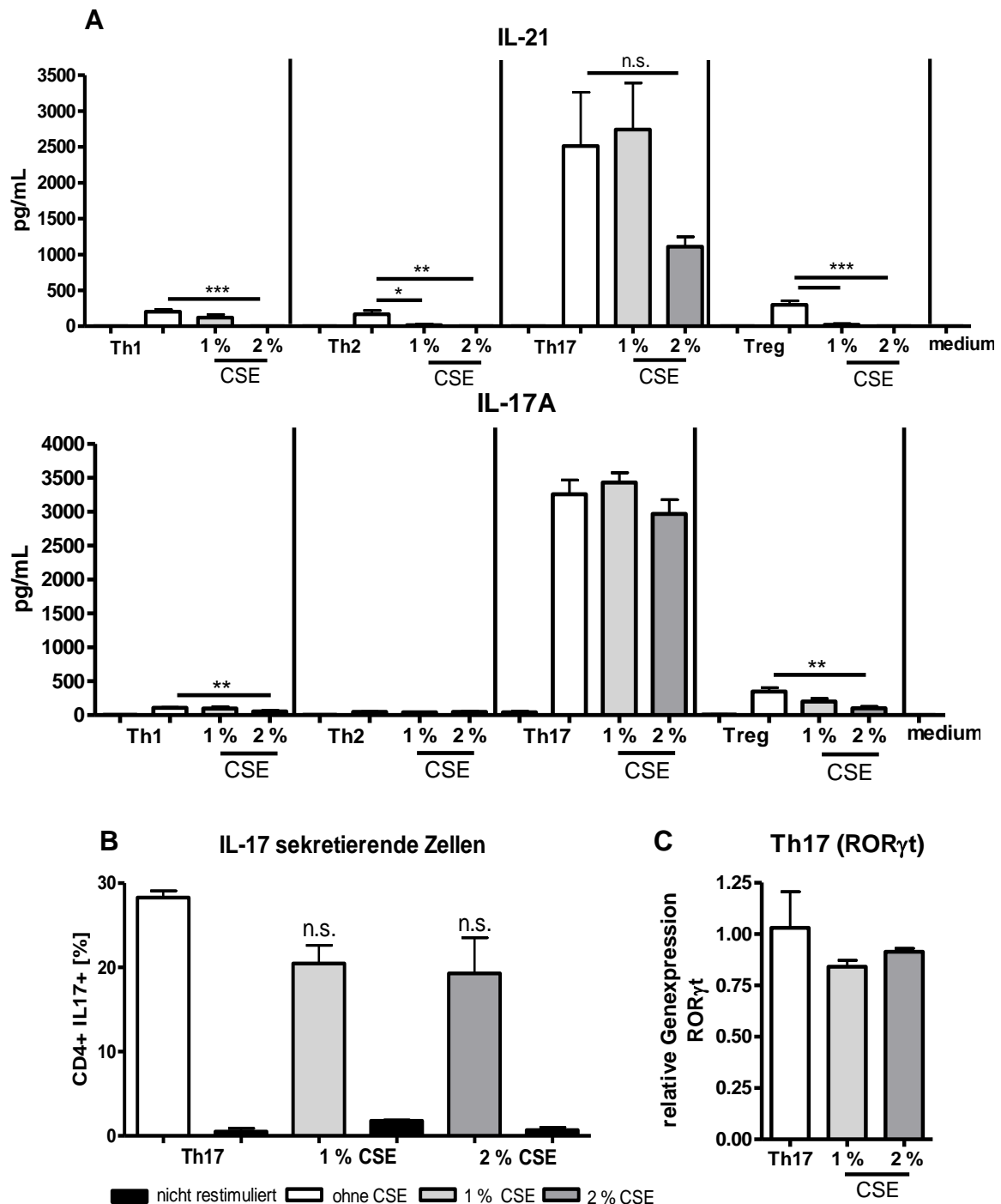


Abb. 28: Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion Th17 spezifischer Zytokine und Bestimmung der relative Genexpression des Th17 Transkriptionsfaktors ROR γ t

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische-Zytokin-Mix für Th1/Th2/Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert (A). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 n.s. = nicht signifikant. Mittels FACS wurden zudem der relative Anteil IL-17 sekretierende Th17 Zellen analysiert (B). Nach 2 Tagen Polarisation wurde mittels qPCR die rel. Genexpression von ROR γ t bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM normalisiert auf das *housekeeping* Gen L32; n=3 Versuchsansätze (C).

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg)

CSE scheint die Differenzierung zu Tregs dramatisch zu inhibieren. Durch die intrazelluläre Färbung des Treg spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp-3 konnte gezeigt werden, dass sich durch CSE im Vergleich zur Mediumkontrolle nur halb so viele Zellen differenzieren. Allerdings wiesen diese Zellen eine verstärkte Intensität der intrazellulären Foxp-3-Färbung auf.

Im Folgenden wurde der Einfluss von CSE auf die Differenzierung der Tregs und der Sekretion der Treg spezifischen Zytokine näher untersucht. Dazu wurden naïve CD4⁺ Zellen mit dem jeweiligen spezifischen Zytokin-Mix ± CSE in verschiedene Th Subpopulationen polarisiert. Nach 3 Tagen Polarisation wurden jeweils 500.000 Zellen für 24 h αCD3 restimuliert und die Menge an den Treg spezifischen Zytokinen, IL-10 und TGF-β bestimmt.

IL-10 wurde mit durchschnittlich 3150 pg/mL von den Th2 Zellen am meisten produziert und nicht von den Tregs (siehe Abb. 29). CSE hatte auf alle getesteten Th Subpopulationen den gleichen inhibierenden Effekt. Dieser inhibierende Effekt von CSE auf die IL-10 Produktion bestätigte sich bei den unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen kultivierten Zellen (siehe Anhang Abb. S6). TGF-β scheint von allen Th Subpopulation mit durchschnittlich 150 pg/mL in gleichen Mengen sekretiert zu werden. Bei den Th1 und Th2 differenzierten Zellen wirkte CSE inhibierend auf die Sekretion von TGF-β. Allerdings zeigten sich für mit 1 % CSE inkubierten Th17 Zellen und Tregs signifikant erhöhte TGF-β Konzentrationen. Dieser Effekt zeigte sich bei den Th17 Zellen mit 2 % CSE nur als Trend und bei den Tregs konnte durch 2 % CSE kein Unterschied zur Kontrolle gesehen werden (siehe Abb. 29).

Auch auf mRNA Ebene zeigte sich durch 1 % CSE nach 2 Tagen Polarisation ein signifikanter Rückgang der relativen Genexpression für den Treg spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp-3 (siehe Abb. 30).

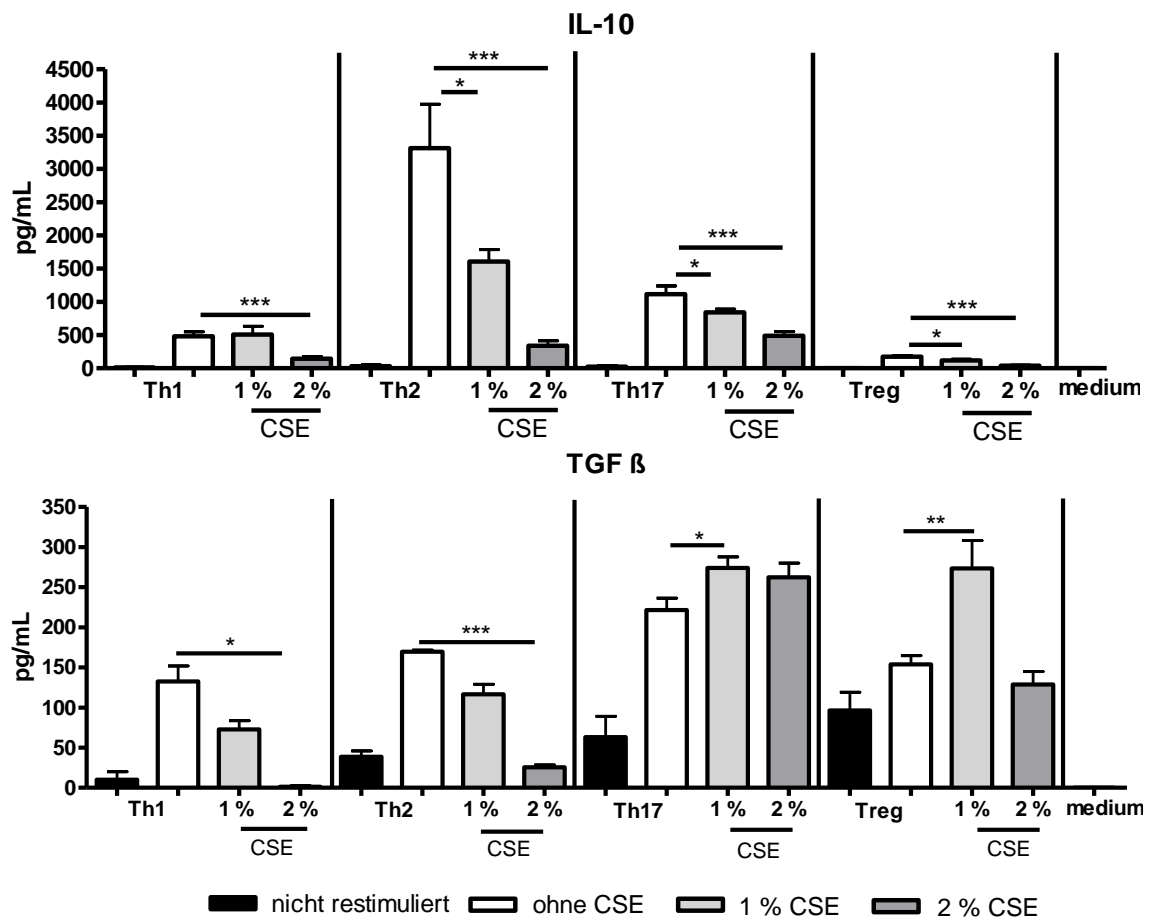


Abb. 29: Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion Treg spezifischer Zytokine

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische-Zytokin-Mix für Th1/Th2/Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen mit jeweils Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

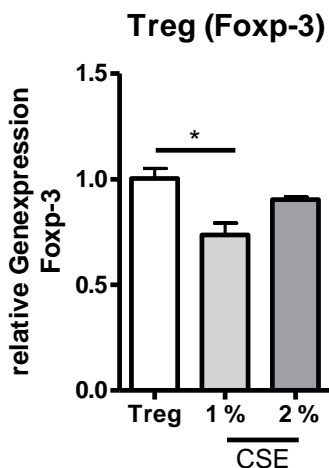


Abb. 30: Bestimmung der relativen Genexpression des Treg Transkriptionsfaktors Foxp-3

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 2 Tage stimuliert und mittels qPCR die relative Genexpression von Foxp-3 bestimmt. Gezeigt sind (normalisiert auf das housekeeping Gen L32 ermittelten Δ CT Werten) Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE n=3 Versuchsansätze, *p<0,05

Einfluss von CSE auf das Th9 assoziierte Zytokin IL-9

Nachdem gezeigt wurde, dass CSE unterschiedliche Effekte auf verschiedene Zytokine der einzelnen Th Subpopulationen hat, wobei die Sekretion der Th2 Zytokine deutlich reduziert wurde, stellte sich die Frage, ob die Expression des primär Th9-assozierten Zytokins IL-9, welches auch von Th2 Zellen sekretiert wird, in den einzelnen Th Subgruppen ebenfalls beeinflusst wird. Für diese Fragestellung wurde der Effekt von CSE auf IL-9 in den einzelnen Th Subgruppen untersucht. Für Th2 und Th17 polarisierte Zellen konnte dabei ein signifikanter Anstieg der IL-9 Produktion durch CSE nachgewiesen werden (siehe Abb. 31A). Dieses Ergebnis korreliert mit den Werten der unter Th0 Bedingungen kultivierten Zellen, die durch 2 % CSE ebenfalls eine signifikant erhöhte IL-9 Produktion aufwiesen (siehe Anhang Abb. S7A). Auf die Sekretion von IL-9 durch Treg hatte CSE bei 2 % einen tendenziell hemmenden Einfluss. Zur weiteren Analyse wurde nachfolgend die relative Genexpression von IL-9 in allen Th Subpopulationen nach 3 Tagen Polarisation und anschließender α CD3 Restimulation für 24 h analysiert.

Dabei zeigte sich, dass von den unterschiedlichen Th-Subpopulationen Th2 Zellen am stärksten IL-9 mRNA exprimierten (siehe Abb. 31B) und dass die relative Genexpression in diesen Zellen durch CSE signifikant verstärkt wurde. Die relative Genexpression von IL-9 war in Th1 Zellen am schwächsten ausgeprägt, wobei durch 2 % CSE eine signifikante Steigerung der Expression erfolgte. In Th17 Zellen und Tregs wurden durch die Einwirkung von CSE keine Änderungen der relativen Genexpression von IL-9 induziert. Die unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen kultivierten Zellen wiesen nur den Trend einer gesteigerten relativen Genexpression von IL-9 auf (siehe Anhang Abb. S7B).

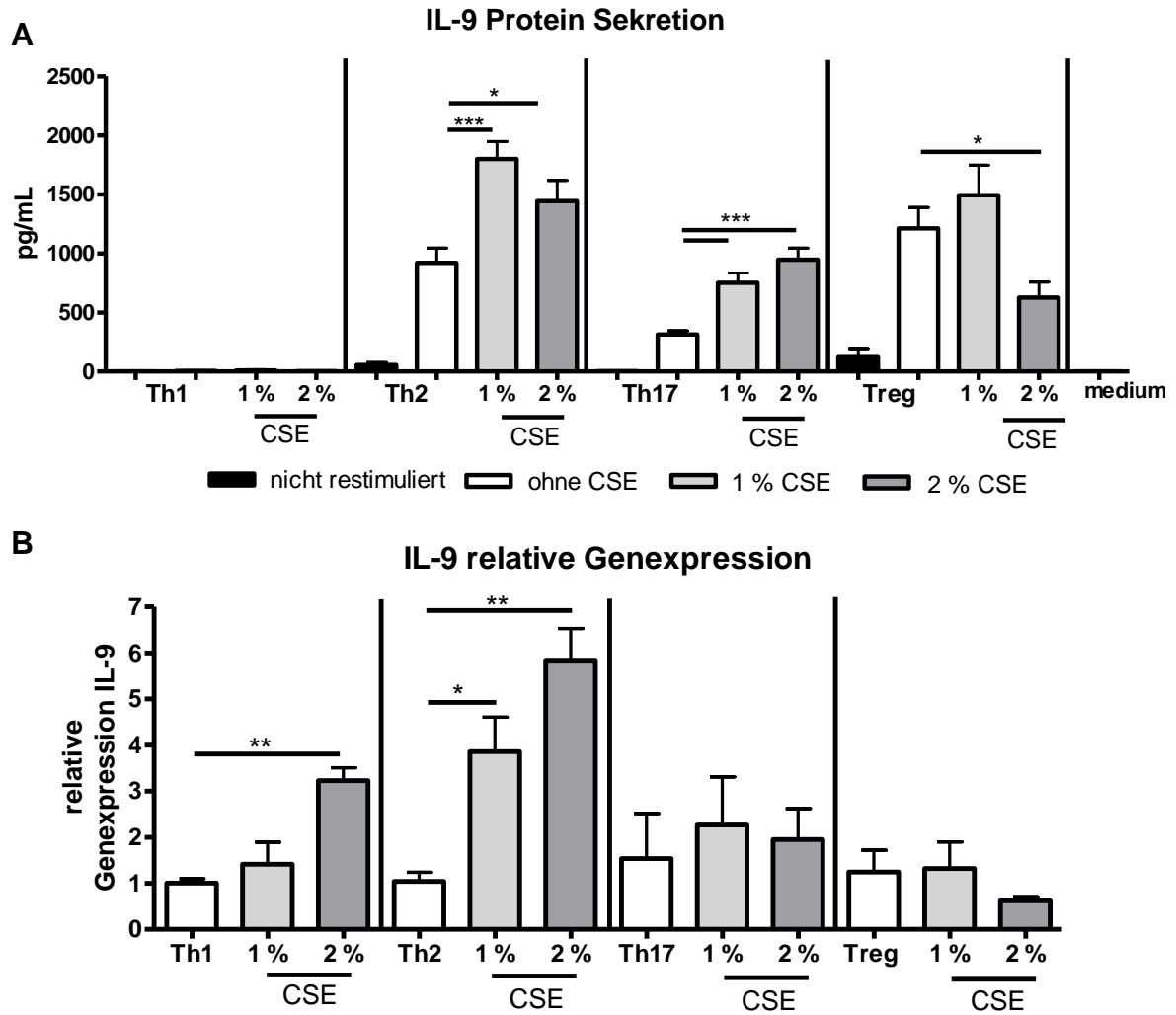


Abb. 31: Effekt von CSE-Medium auf die Sekretion und relative Genexpression von IL-9 in unterschiedlich polarisierten Th Zellen

Aufgereinigte naïve CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spezifische Zytokin-Mix für Th1/Th2/Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28

± CSE für 3 Tage stimuliert, anschließend wurden 500.000 Zellen für weitere 24 h α CD3 restimuliert. (A) Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=2 Versuchsansätzen mit jeweils Triplikaten. (B) Von den Zellpellets wurde mittels qPCR die relative Genexpression von IL-9 bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE, ΔCT normalisiert auf das *housekeeping* Gen L32, n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

IL-9 Induktion während der Th2 Differenzierung

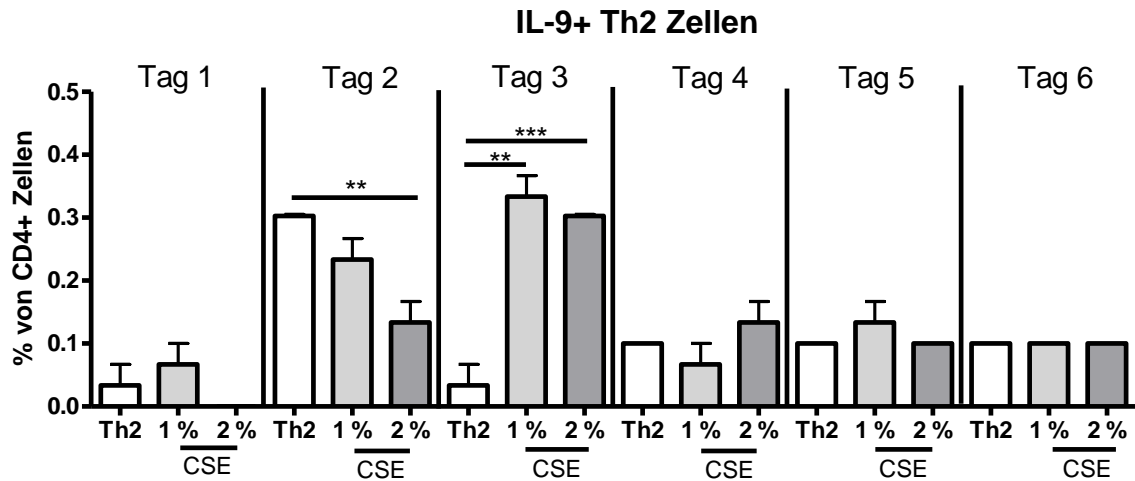
In den vorherigen Untersuchungen wurde interessanterweise beobachtet, dass CSE einen deutlich, induzierenden Effekt auf die Produktion von IL-9 in Th2 polarisierten Zellen zeigt. Dieses Ergebnis hat weiterführende Untersuchungen speziell zur Induktion von IL-9 durch CSE angeregt. Dabei wurde zunächst die Fragestellung verfolgt, zu welchem Zeitpunkt die IL-9 Induktion während der Th2 Differenzierung erfolgt und ob diese Induktion durch CSE beeinflusst wird. Dazu wurde die Kinetik der IL-9 Produktion während der Th2 Polarisation untersucht. Dieser Versuch wurde in Abwesenheit und Gegenwart von IL-2 durchgeführt, da in der Literatur beschrieben ist, dass die IL-9 Produktion von IL-2 abhängig ist (Schmitt et al. 1994).

Im Versuch ohne anfängliche Gabe von IL-2 konnte mittels intrazellulärer FACS Färbung für IL-9 nur eine kleine Population IL-9+ Zellen nachgewiesen werden (< 0,5 %) (siehe Abb. 32A). Im Versuch mit initialer Gabe von IL-2 konnte das Maximum der durch CSE induzierten IL-9 Produktion an Tag 3 (4 - 5 %) auf einem deutlich höheren Niveau bestätigt werden.

Mit diesen Versuchen konnte bestätigt werden, dass die anfängliche Gabe von IL-2 während der Polarisation von Th2 Zellen für eine gesteigerte IL-9 Produktion obligatorisch ist.

Für eine vergleichbare Darstellung der intrazellulären Marker während der Differenzierung von Th Zellen wurde die relative Zellzahl IL-9 + Zellen während der Th2 Polarisation mit anfänglicher Gabe von IL-2 an Tag 3 und Tag 6 untersucht. Mit diesen Versuchen konnte bestätigt werden, dass CSE eine signifikante Steigerung der Anzahl an IL-9+ Zellen an Tag 3 induziert. Die relative Zellzahl der IL-9+ Zellen wurde bei mit 2 % CSE inkubierten Zellen um das ca. 15fache gesteigert (siehe Abb. 33).

A



B

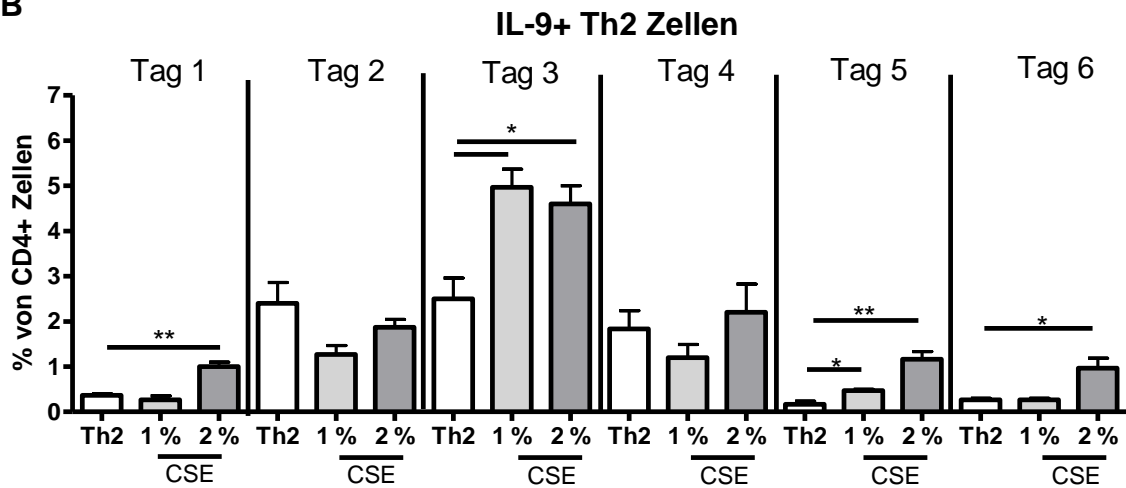


Abb. 32: Kinetik der Entwicklung IL-9+ Zellen während der Differenzierung von Th2 Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE (A) ohne IL-2 und (B) mit IL-2 für 1-6 Tage polarisiert und jeweils für 4 h, für die intrazelluläre Färbung am FACS, mit BrefA/ Ionomycin und PMA restimuliert und nach Fixierung mit 2 % PFA gefärbt und analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM n=1-2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

A

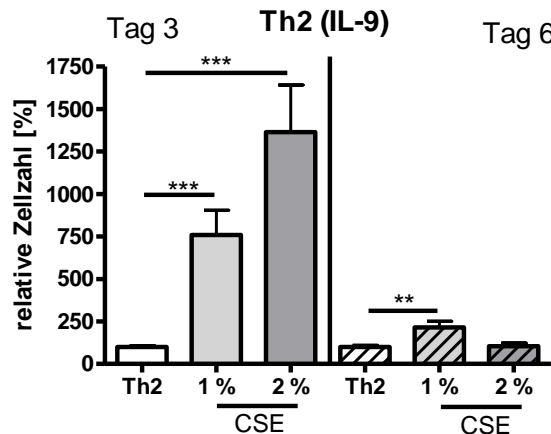
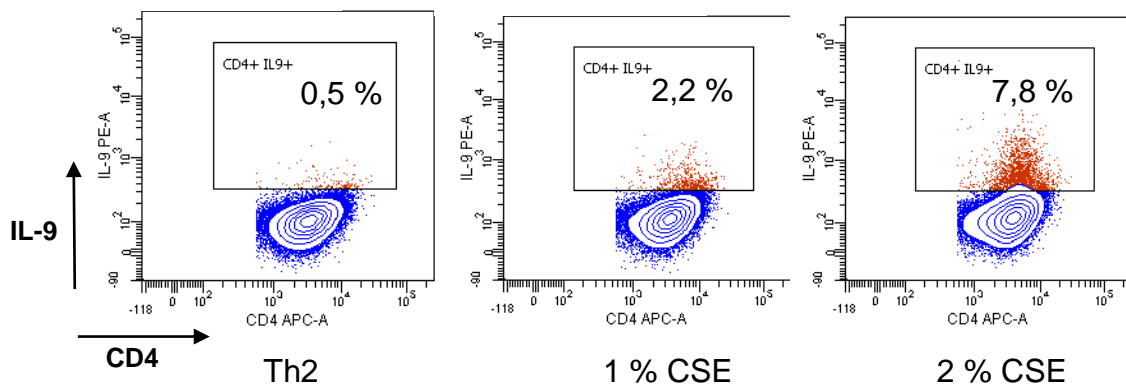


Abb. 33: Einfluss von CSE-Medium auf die IL-9 Produktion während der Differenzierung von Th2 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen + IL-2 mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Quantifizierung IL-9-positiver Zellen erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/ Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind (A) Mittelwerte \pm SEM von n=5 Versuchsansätzen in Triplikaten, **p<0,01 und ***p<0,001 und (B) repräsentative Dot Plots von Tag 3.

B



Aus dem Kinetik Versuch in Gegenwart von IL-2 wurden anschließend die CSE bedingten Unterschiede der mRNA Expressionen einiger Th2 und Th9 assoziierter Zytokine und Transkriptionsfaktoren bestimmt.

IL-9 mRNA wurde erst nach 2 Tagen Stimulation und 24 h α CD3 Restimulation gesteigert exprimiert, wobei der verstärkende Effekt von CSE erst am Tag 3 als signifikant ermittelt wurde (siehe Abb. 34 Tag 2 und Tag 3). Dieser verstärkende Effekt konnte für 2 % CSE bis Tag 5 nachgewiesen werden. Das Th2 spezifische Zytokin IL-13 wurde erst ab Tag 2 exprimiert, wobei sich für 1 % CSE ein verminderte Genexpression zeigte. An Tag 3 wurden für die verschiedenen CSE Konzentrationen widersprüchliche Ergebnisse nachgewiesen. Für Zellen mit 1 % CSE zeigte sich eine leicht gesteigerte und für Zellen mit 2 % CSE eine verminderte relative Genexpression von IL-13. Diese verminderte Expression konnte für Zellen mit 2 % CSE auch an Tag 4

noch ermittelt werden und die mit 1 % CSE kultivierten Th2 Zellen zeigten an Tag 4 und 5 keinen Unterschied mehr zu unbehandelten Zellen. An Tag 5 konnte wiederum für die Th2 Zellen mit 2 % CSE ein Trend für gesteigerte relative IL-13 Expression gezeigt werden (siehe Abb. 34).

Zudem konnte gezeigt werden, dass durch CSE die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 mit höheren Konzentrationen von CSE zunächst vermindert wurde, während nach 5 Tagen durch CSE eine gesteigerte Expression detektiert wurde, was für eine Verzögerung der Differenzierung zu typischen Th2 Zellen sprechen könnte (siehe Abb. 35). Der Transkriptionsfaktor BATF, der essentiell für die Th2, Th9 und Th17 Entwicklung ist, wurde anfänglich nicht durch CSE beeinflusst. Allerdings ergab sich an Tag 3 mit einer niedrigen Konzentration von CSE eine Verstärkung der relativen Genexpression, welche letztlich an Tag 5 für beide Konzentrationen detektiert wurde (siehe Abb. 35). Außerdem wurde der mit Th9 assoziierte Transkriptionsfaktor PU.1 in der Kinetik analysiert. Hier zeigte sich für 1 % CSE eine transiente Steigerung der Expression von PU.1 an Tag 2. Diese Steigerung der PU.1 Expression konnte ebenfalls für 2 % CSE an Tag 3 nachgewiesen werden. Dabei ist ein Anstieg durch 2 % CSE an Tag 2 wahrscheinlich, wenn auch auf Grund fehlender Datenpunkte nicht definitiv nachweisbar. Dieser Expressionsanstieg könnte die gesteigerte IL-9 Sekretion ab Tag 3 erklären (siehe Abb. 35).

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass CSE Zellen während der Th2 Differenzierung dahingehend beeinflusst, transient eine Th9 ähnlichen Phänotyp zu entwickeln.

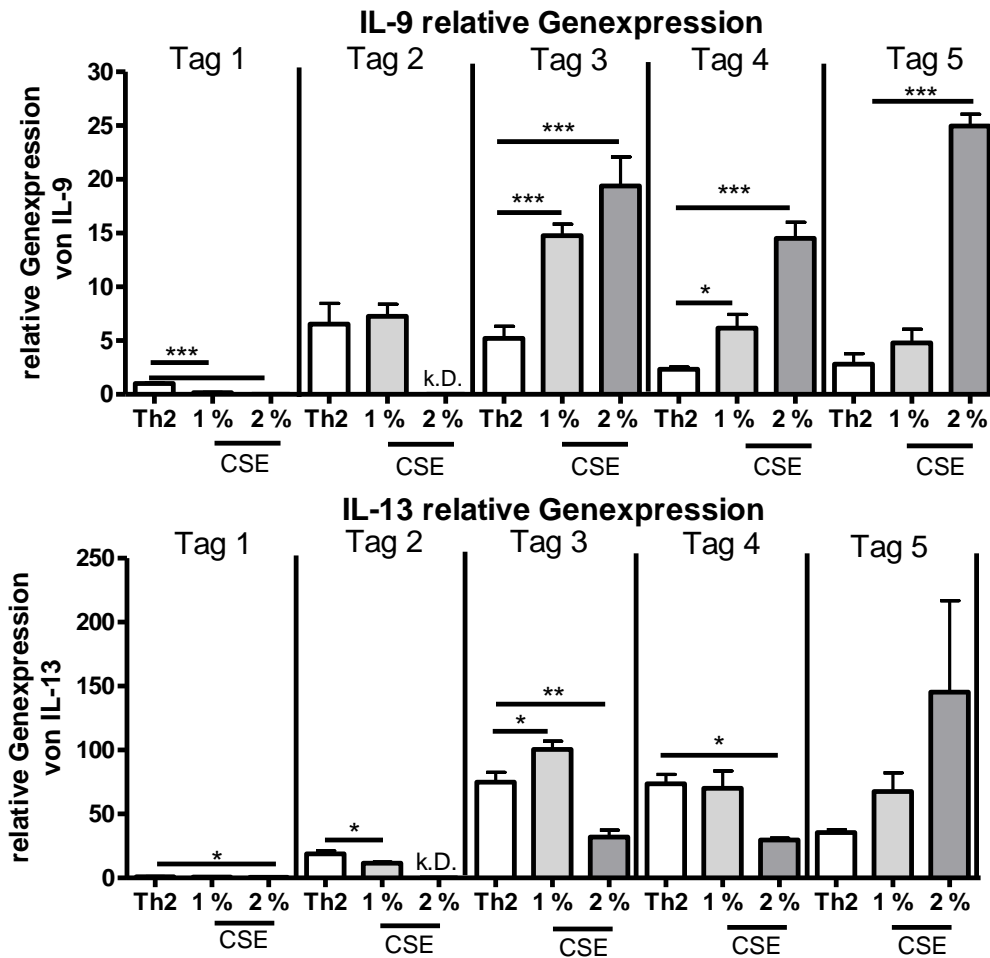


Abb. 34: Zeitabhängige Genexpression von IL-9 und IL-13 in Th2 polarisierten Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 1-5 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h α CD3 restimuliert. Die relative Genexpression für IL-9 und IL-13 wurde mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE von Tag1, n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001; k.D.= keine Daten verfügbar

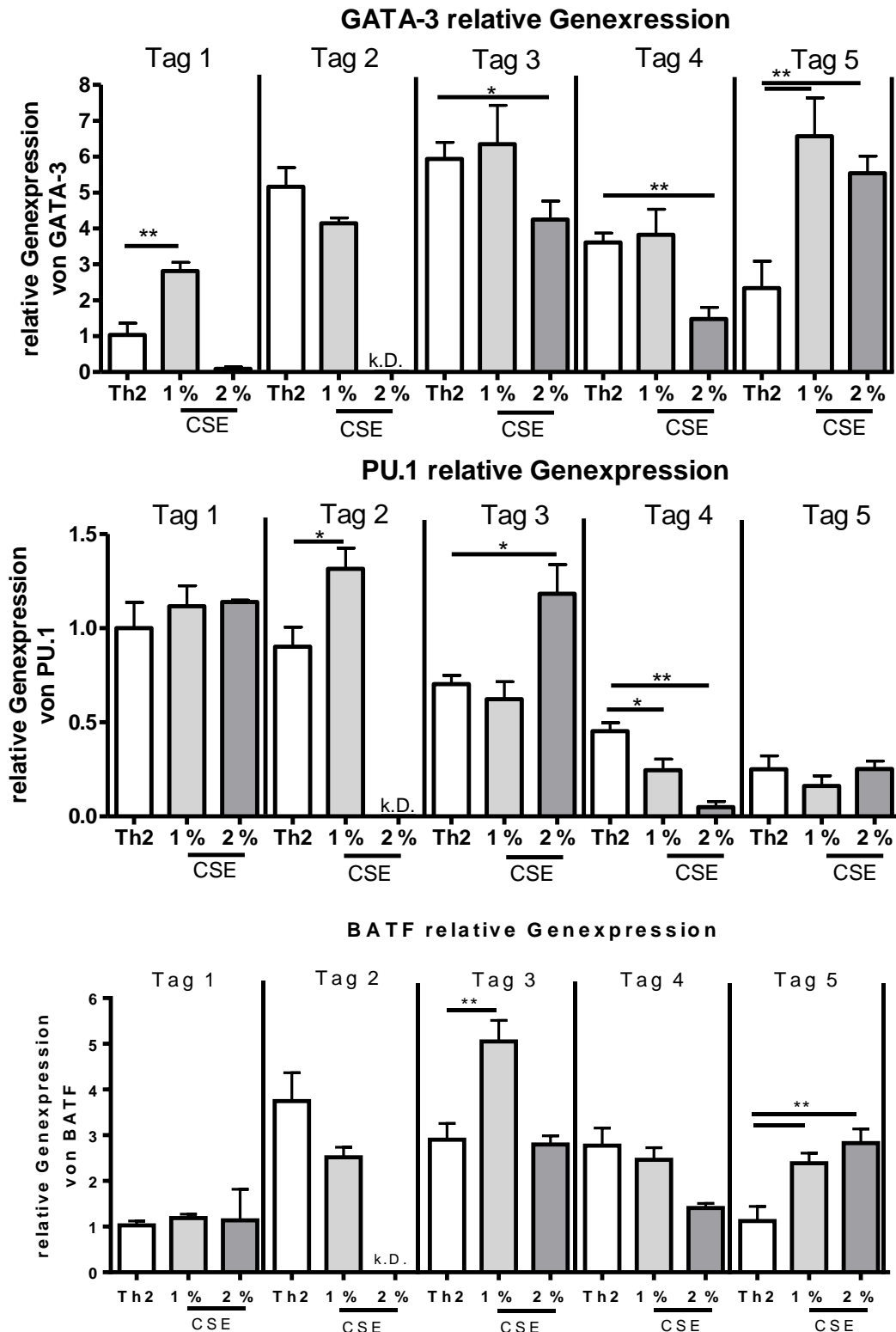


Abb. 35: Zeitabhängige Expression Th2 und Th9 assoziierter Transkriptionsfaktoren in Th2 polarisierten Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 1-5 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h α CD3 restimuliert. Die relative Genexpression für GATA-3, PU.1 und BATF wurde mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind normalisiert auf das *housekeeping* Gen L32 Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE von Tag 1, n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05 und **p<0,01 k.D.= keine Daten verfügbar

Einfluss von CSE auf die Differenzierung von Th9 Zellen

Aus den beschriebenen Beobachtungen entwickelte sich die Frage, ob CSE auch einen fördernden Effekt auf die IL-9 Produktion von Th9 Zellen ausüben kann. Um dieser Fragestellung nach zu gehen, wurde zunächst der Einfluss von CSE auf die Proliferation von Th9 Zellen getestet. Dafür wurden naïve CD4+ Zellen mit dem Th9 spezifischen Zytokin Mix wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert und analysiert.

Wie auch für die anderen Th Subpopulationen beobachtet wurde, zeigte sich für die Th9 Zellen durch CSE eine Verzögerung der Proliferation. Diese verzögerte Teilungsrate konnte nach 48 und 72 h anhand signifikant höherer MFI nach Färbung mit CFSE (siehe Abb. 36A) ermittelt werden. An Tag 3 war diese Verzögerung der Proliferation in der CSE-vermittelten Reduktion des Proliferationsindex von durchschnittlich 410 auf Werte von nur 220 (1 % CSE) und 120 (2 % CSE) (siehe Abb. 36B) deutlich zu erkennen. Ebenso wie für die anderen Subpopulationen (siehe Abb. 9) konnte auch für Th9 Zellen gezeigt werden, dass nach 144 h kein Unterschied in der CFSE-Färbung zu beobachten war und somit durch CSE nur eine Proliferationsverzögerung und keine gänzliche Hemmung induziert wurde (siehe Abb. 36C).

Zudem wurde beobachtet, dass obwohl CSE die Proliferation der Th9 Zellen wie beschrieben verzögert, die IL-9 positiven CD4+ Zellen die höchste Proliferationsrate aufwiesen. Dies zeigte sich daran, dass die Proliferationspeaks der CD4+ IL-9+ Zellen in dem vorderen, also linken Bereich der Proliferationspeaks der Gesamt-CD4+-Population lagen (siehe Abb. 37A 72 h rot). Auch in der Gesamtbetrachtung zeigte sich anhand der signifikant geringeren MFI, dass die CD4+ IL-9+ signifikant stärker proliferiert sind, als die CD4+ IL-9- Zellen (siehe Abb. 37B).

Im Anschluss wurde der Einfluss von CSE auf die IL-9 Produktion von Th9 Zellen untersucht. Auch für diese Zellen zeigte sich eine deutlich größere Population IL-9 positiver Zellen mit erhöhter relativen MFI (siehe Abb. 38A). Somit wurde auch unter Bedingungen der Th9 Differenzierung durch die Inkubation mit CSE eine signifikante IL-9 Induktion aufgezeigt (siehe Abb. 38B). In den nach Th9 polarisierten Zellen waren durch die Inkubation mit CSE im

Vergleich zur Kontrollgruppe zudem geringere Mengen an IFN γ +, IL-17+ und Foxp-3+ Zellen nachweisbar (siehe Anhang Abb. S12).

Die durch CSE gesteigerte IL-9 Produktion der Th9 Zellen konnte auch mit einem weiteren Testsystem (siehe 2.2.8 ELISA) bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass CSE die IL-9 Sekretion durch Th9 Zellen nach 3 Tagen Polarisation signifikant verstärkte (siehe Abb.39).

Für Th2 polarisierte Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass CSE auch die relative Genexpression von IL-9 fördernd beeinflusst. Im Folgenden wurde die zeitabhängige IL-9 Expression und der CSE Effekt von CSE auf Th9 Zellen bestimmt und zum Vergleich mit Daten aus Th2 polarisierten Zellen dargestellt. Dabei zeigte sich eine erhöhte relative Genexpression von IL-9 in Th2 Zellen durch 1 % CSE bereits an Tag 2 für beide CSE-Konzentrationen an Tag 3, bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe des jeweiligen Analysetages (siehe Abb. 40). Für die Th9 Zellen konnte die gesteigerte relative IL-9 Genexpression durch CSE schon an Tag 2 für beide Konzentrationen von CSE nachgewiesen werden. Nach 3 Tagen ließ sich für mit 1 % CSE polarisierten Zellen kein Unterschied mehr detektieren, wobei die Inkubation mit 2 % CSE immer noch eine gesteigerte relative Genexpression zur Folge hatte.

Aus diesen und vorherigen Ergebnissen ergibt sich, dass CSE die Th2 Zellen während ihrer Differenzierung zu einer IL-9 produzierenden Subgruppe triggert und dass Th9 Zellen durch CSE in ihrer IL-9 Produktion gesteigert werden.

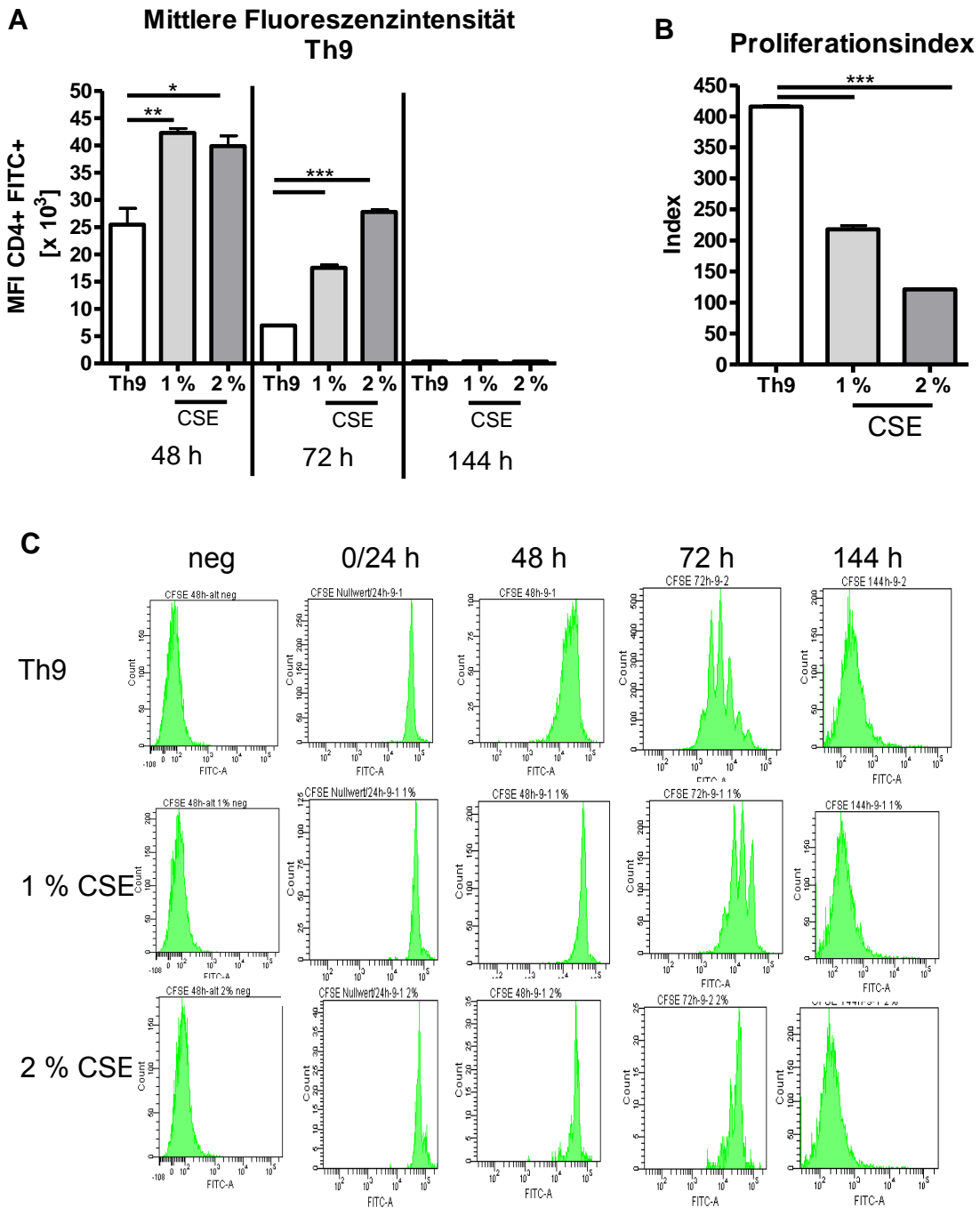


Abb. 36: Einfluss des CSE-Mediums auf die Proliferation von Th9 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Th9 Zytokin Cocktail \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) nach verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE, Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätze; (B) den, wie in Abb. 3 beschrieben, berechneten Proliferationsindex für 72 h Differenzierung und (C) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

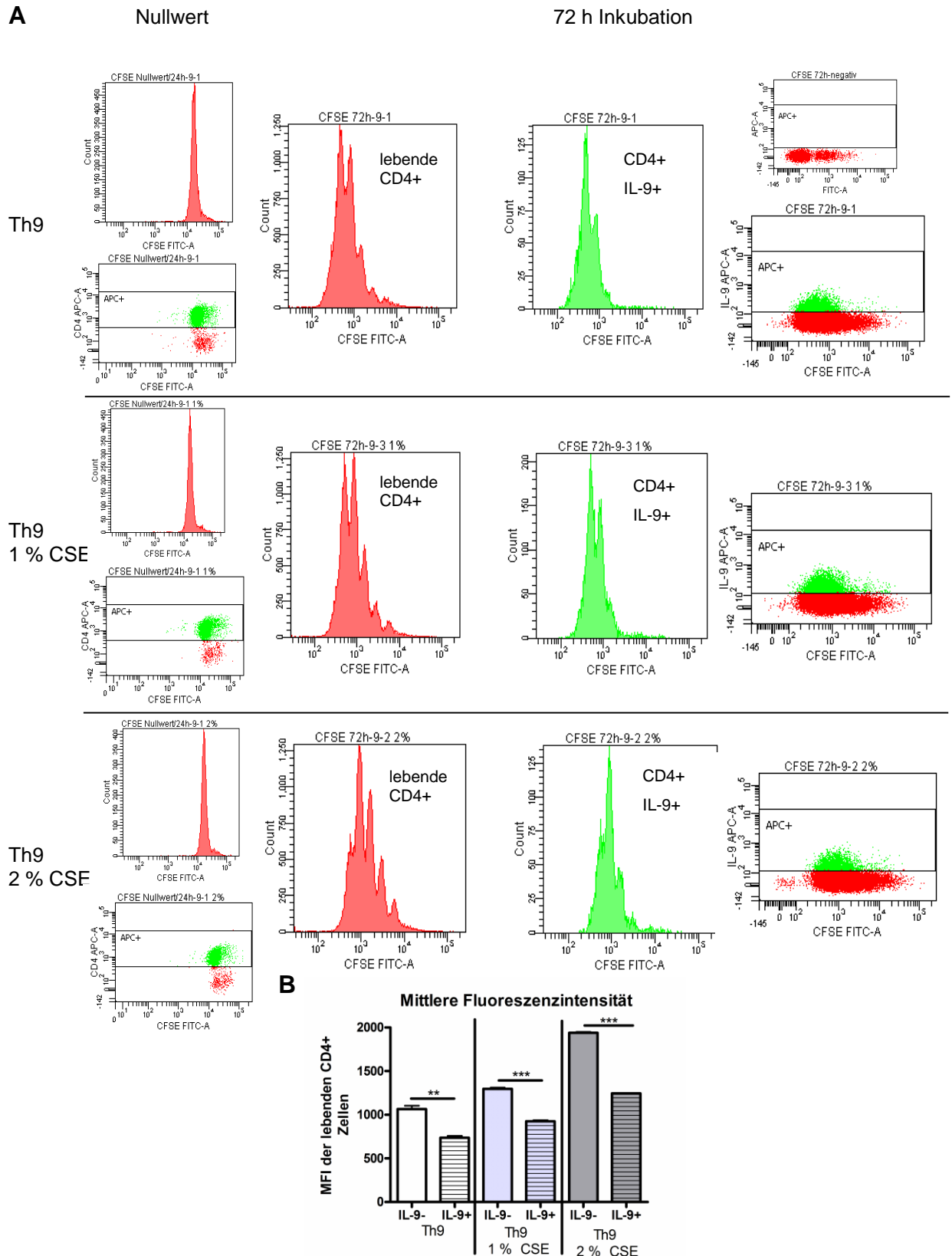


Abb. 37: Bestimmung des Proliferationsstatus von IL-9+ Th9 Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Th9 Zytokin-Mix \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden CD4+ Zellen (DAPI negativ) nach 0 und 72 h Kultivierung (A) repräsentative Histogramme bzw. Dot Plots von IL-9+ Zellen \pm CSE und (B) die MFI nach 72 h Kultivierung der CD4+ IL-9+ und CD4+ IL-9- Zellen, n=3 Versuchsansätze, **p<0,01 und ***p<0,001.

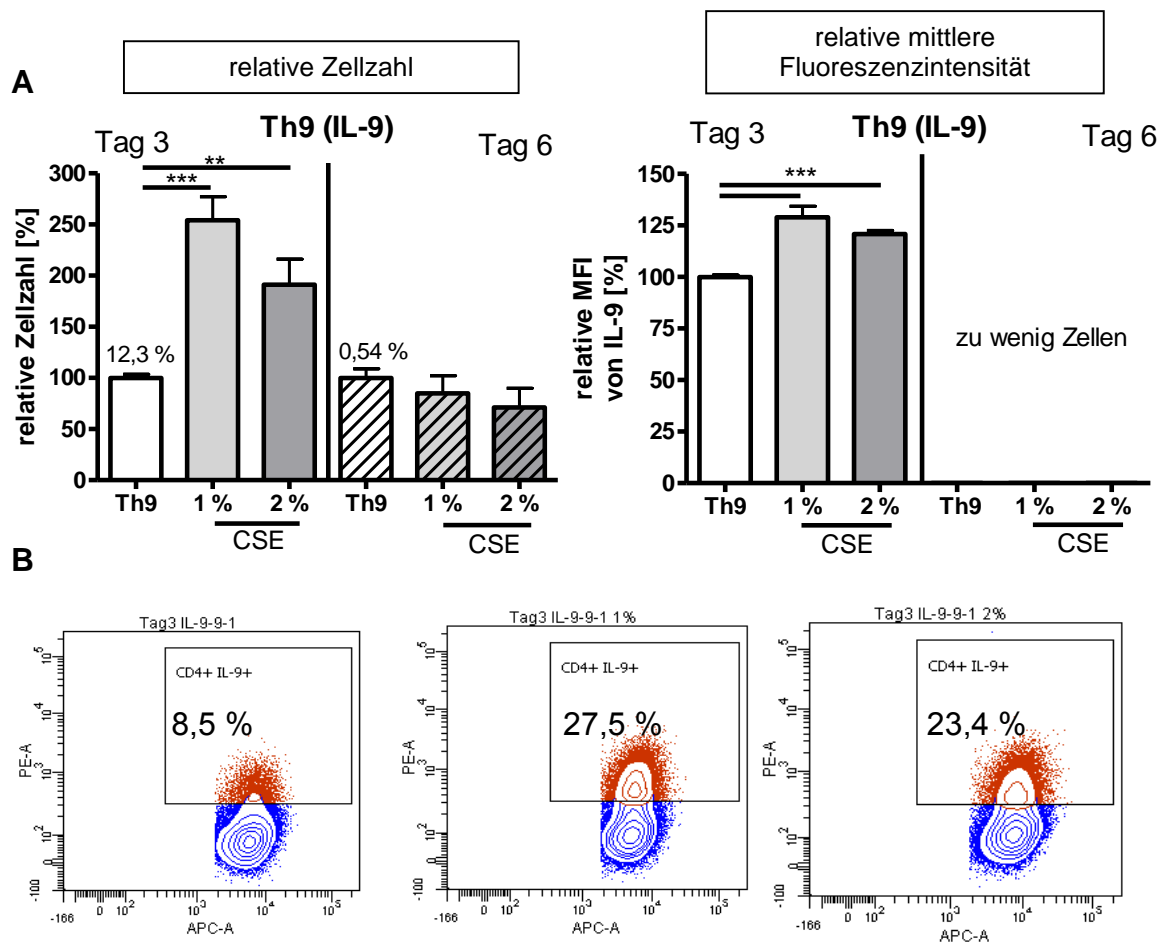


Abb. 38: Einfluss von CSE-Medium auf die Differenzierung von Th9 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th9 Bedingungen + IL-2 mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Quantifizierung IL-9-positiver Zellen erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/ Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind die relative Zellzahlen und die MFI des prozentualen Anteiles der IL-9⁺ Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle als Mittelwerte \pm SEM von n=4 Versuchsansätzen in Triplikaten, **p<0,01 und ***p<0,001 und (B) repräsentative Dot Plots von Tag 3

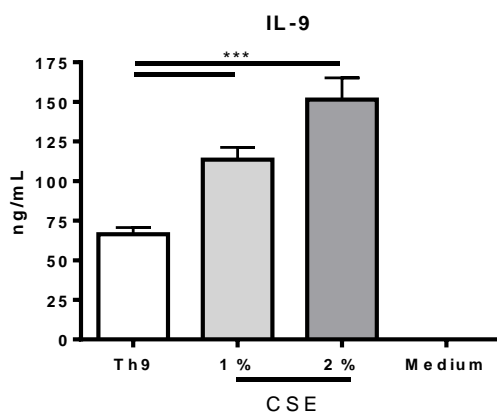


Abb. 39: Einfluss von CSE-Medium auf die IL-9 Sekretion von Th9 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th9 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 3 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels ELISA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen in Triplikaten, ***p<0,001

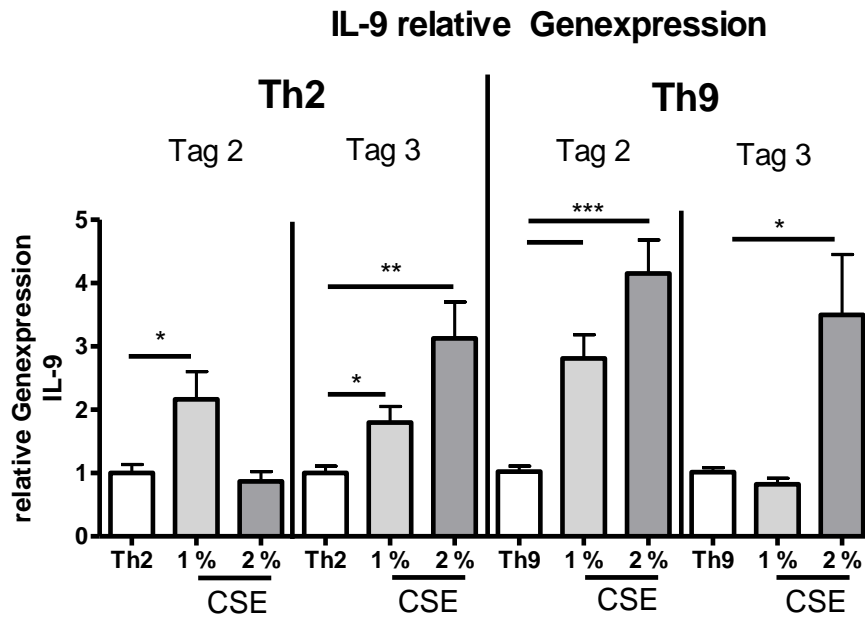


Abb. 40: Vergleich der zeitabhängigen Expression von IL-9 in Th2 und Th9 polarisierten Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 und Th9 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 2 beziehungsweise 3 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert und die relative Genexpression für IL-9 wurde mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des *housekeeping* Gens L32), n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

Weitere Einflüsse von CSE auf die Sekretion von Zytokinen und Expression Th spezifischer Transkriptionsfaktoren in Th2 und Th9 polarisierten Zellen

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass CSE sowohl in den Th2 Zellen, hier auf einem niedrigeren Level, als auch in den Th9 Zellen einen induzierenden Effekt auf den Anteil der entstandenen IL-9+ Population bewirkt. Nun stellte sich die Frage, ob neben IL-9 auch andere Zytokine auf Proteinebene in ihrer Sekretion (IFN γ , IL-6, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-10) in den mit CSE inkubierten Th2 und Th9 polarisierten Zellen beeinflusst werden. Zudem stellte sich die Frage, inwieweit CSE die Th2 und Th9 Zellen während ihrer Differenzierung, parallel zu der beobachteten Induktion von IL-9 positiven Zellen, auch auf der Genebene für andere Marker (spezifische Transkriptionsfaktoren: PU.1, BATF, GATA-3, Tbet und Foxp-3) beeinflusst.

Dafür wurden Th2 und Th9 polarisierte Zellen hinsichtlich ihrer zeitabhängigen Sekretion der oben aufgeführten Zytokine, sowie der Expression der aufgeführten Marker, nach Zugabe von CSE miteinander verglichen.

Generell wurde gezeigt, dass CSE die Sekretion von allen untersuchten Zytokinen vergleichbar in Th2 und Th9 Zellen während der Polarisation inhibiert.

Im Einzelnen wurde gezeigt, dass IFN γ von Th2 und Th9 differenzierten Zellen nachweisbar sekretiert wird, wobei die Th9 Zellen an Tag 2 und Tag 3 geringfügig mehr IFN γ produzierten (siehe Abb. 41). Nach 3 Tagen Polarisation sekretierten die unbehandelten Kontrollen beider Zelltypen mehr IFN γ , was durch die Zugabe von CSE während der Polarisation beider Th Subgruppen inhibiert wurde.

Obwohl nach 3 Tagen Differenzierung eine stärkere Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 durch Th9 Zellen im Vergleich zu den Th2 Zellen detektiert wurde, konnte bei beiden CD4+ Subpopulation der gleiche zeitabhängige CSE bedingte Effekt nachgewiesen werden. Die mit 2 % CSE kultivierten Zellen beider Subtypen zeigten eine signifikant verminderte IL-6 Produktion (siehe Abb. 41), während die geringere Konzentration an CSE nach 3 Tagen Polarisation zu einer gesteigerten Produktion von IL-6 führte (siehe Abb. 41).

Für die Th2 spezifischen Zytokine IL-5 und IL-13, sowie das Treg assoziierte Zytokin IL-10 stellte sich ebenfalls für beide Th Subtypen das gleiche Bild dar. Die Produktion der Zytokine steigerte sich von Tag 2 auf Tag 3, allerdings wurde die Sekretion durch den Einfluss von CSE signifikant gemindert (siehe Abb. 41).

Das Th17 assoziierte Zytokin IL-17A wurde vermehrt nur von Th9 Zellen nach 3 Tagen Polarisation produziert. In den Th2 Zellen konnte an beiden Tagen, auch durch die Einwirkung von CSE-Medium, keine bedeutende Produktion von IL-17A beobachtet werden. Die Th9 Zellen zeigten nach 2 Tagen Polarisation zunächst auch nur eine geringe Sekretion von IL-17A, die durch CSE nicht bedeutend beeinflusst wurde. Nach 3 Tagen produzierten die Th9 Zellen allerdings mit durchschnittlich 542,5 pg/mL deutlich mehr IL-17A als die Th2 Zellen. Allerdings wurde die IL-17A Produktion der Th9 Zellen durch die Inkubation mit 2 % CSE im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant inhibiert.

Des Weiteren wurde die zeitabhängige mRNA Expression verschiedener Th spezifischer Transkriptionsfaktoren in Th2 und Th9 Zellen unter dem Einfluss von CSE verglichen. Generell wurde gezeigt, dass CSE die relative Genexpression von allen untersuchten Transkriptionsfaktoren vergleichbar in den Th2 und Th9 Zellen während der Differenzierung schon nach 2 Tagen Polarisation steigerte. Im Einzelnen wurde die relative Genexpression des Th9 assoziierten Transkriptionsfaktors PU.1 durch CSE in Th2 Zellen nach 3 Tagen Polarisation signifikant hochreguliert (siehe Abb. 42). In den Th9 Zellen wurden durch CSE die relative Genexpression von PU.1 kaum beeinflusst.

Der für die Entwicklung von Th17, Th2 und Th9 Zellen essentielle Transkriptionsfaktor BATF war in seiner relativen Genexpression durch CSE in den Th2 Zellen zunächst nach 2 Tagen gehemmt und nach 3 Tagen signifikant erhöht. Bei den Th9 Zellen zeigt sich nur an Tag 2 ein induzierender Effekt durch CSE auf die relative Genexpression von BATF (siehe Abb. 42).

Die relative Genexpression des Th2 spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3, wurde wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt: Kinetik der IL-9 Induktion während der Th2 Differenzierung) durch CSE nach 2 Tagen Polarisation in den Th2 Zellen gehemmt, zeigte aber nach 3 Tagen keinen Unterschied mehr zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Th9 Zellen wiesen durch CSE einen

transienten Anstieg der relativen Genexpression von GATA-3 an Tag 2 auf (siehe Abb. 42).

Da die Expression dieses Th2 spezifischen Transkriptionsfaktors in den Th9 Zellen erhöht war, wurden auch die linienspezifischen Transkriptionsfaktoren für Tregs und Th1 Zellen, Foxp-3 und Tbet, analysiert.

Auch für diese Transkriptionsfaktoren konnte durch CSE eine induzierende Wirkung auf die relative Genexpression nachgewiesen werden. Die Polarisation mit 2 % CSE führte an Tag 2 und Tag 3 zu einer gesteigerten mRNA Expression von Foxp-3 in Th2 Zellen (siehe Abb. 42). Für die Th9 Zellen konnte zunächst nach 2 Tagen Polarisation eine durch CSE gesteigerte relative Genexpression von Foxp-3 beobachtet werden (siehe Abb. 42), allerdings zeigte sich nach 3 Tagen Polarisation mit 1 % CSE eine leicht verminderte relative Genexpression von Foxp-3 und mit 2 % CSE nun kein Unterschied mehr zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die relative Genexpression des Th1 spezifischen Transkriptionsfaktors Tbet wurde bei den Th9 Zellen durch CSE ähnlich beeinflusst, wobei die Tbet Expression nach 2 Tagen erheblich stärker induziert wurde und unter CSE-Einfluss bis auf das über 10fache anstieg (siehe Abb. 42). Nach 3 Tagen war dieser Effekt allerdings nicht mehr nachweisbar. Die relative Genexpression von Foxp-3 und Tbet wurde auch bei den Th2 Zellen durch CSE hochreguliert. Allerdings konnte nur für 2 % CSE polarisierte Zellen eine signifikante Regulation detektiert werden (siehe Abb. 42).

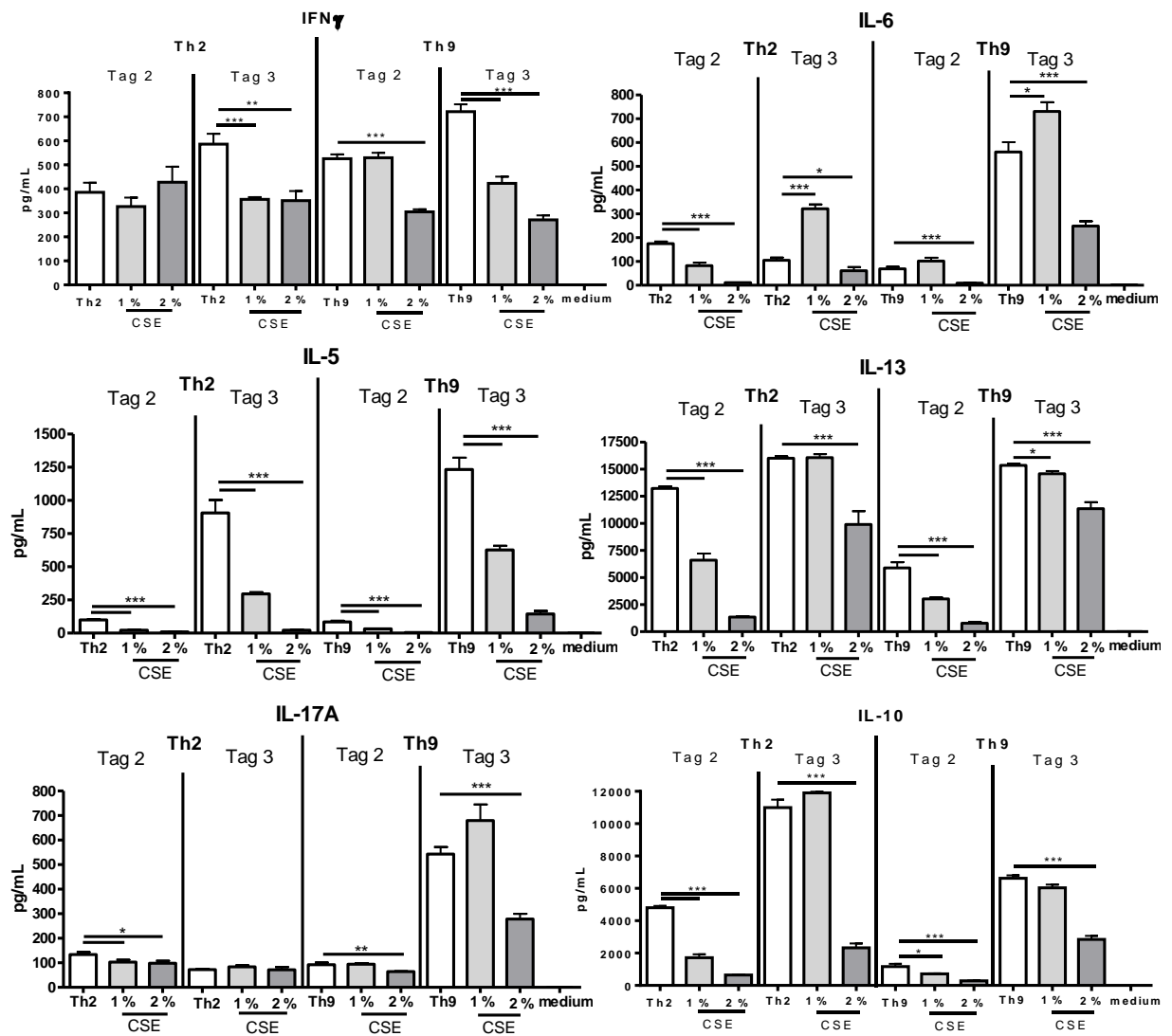


Abb. 41: Vergleich von Th2 und Th9 zeitabhängiger Sekretion verschiedener Zytokine unter Einfluss von CSE-Medium

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 und Th9 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 2 und 3 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

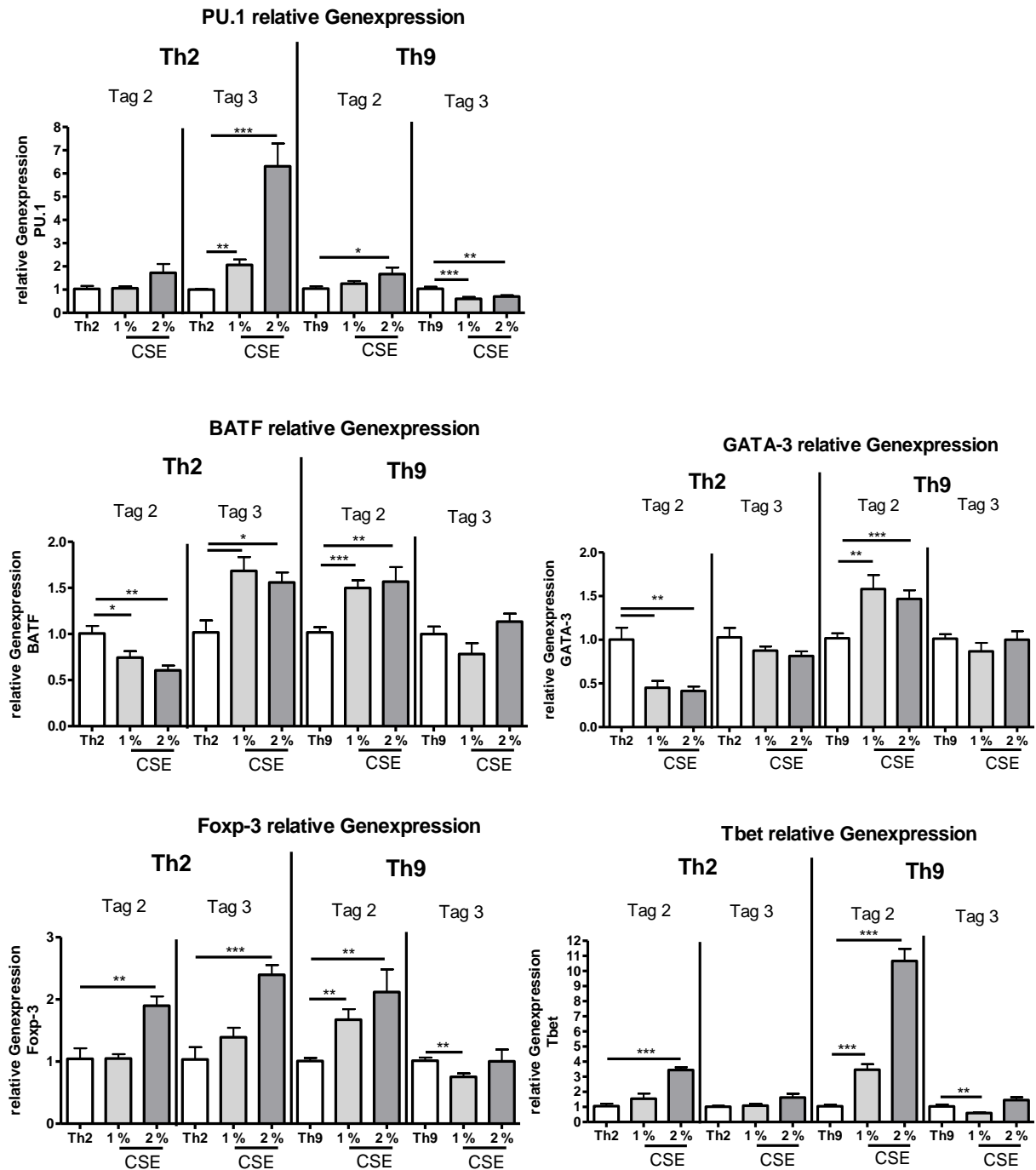
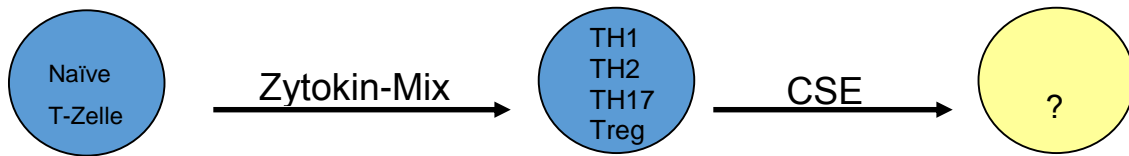


Abb. 42: Vergleich der zeitabhängigen Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Th2 und Th9 differenzierten Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th2 und Th9 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE mit IL-2 für 2 beziehungsweise 3 Tage polarisiert und dann jeweils 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert und die relative Genexpression für PU.1, BATF, GATA-3, Foxp-3 und Tbet wurde mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE (normalisiert auf die ermittelten ΔCT Werte des *housekeeping* Gens L32), n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

Für die Untersuchungen der Auswirkung von CSE-Medium auf die Differenzierung von Th1/ Th2 / Th9 /Th17 und Tregs kann zusammenfassend festgehalten werden, dass CSE die Proliferation von Th1 Zellen verzögert, aber deren Differenzierung unterstützt. Nach 3 Tagen Polarisation mit CSE haben sich weniger IFN γ + Zellen differenziert, aber diese Th1 Zellen zeigen eine signifikant höhere IFN γ + Produktion. Gleichzeitig inhibiert CSE die Differenzierung von Tregs deutlich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CSE zu einer Induktion einer IL9+ Th2 Population führt und signifikant die IL-9 Produktion in den Th9 Zellen induziert bzw. verstärkt.

3.1.5 Untersuchung der Auswirkung von CSE-Medium auf bereits differenzierte CD4+ Zellen (Th1/ Th2/ Th17 und Tregs)



Für die Fragestellung welchen Effekt CSE auf bereits differenzierte Th Subpopulationen hat, wurden naïve CD4+ Zellen wie in 3.1.2 beschrieben isoliert und für 3 Tage mit α CD3 + α CD28 und dem jeweiligen Th-Subtyp-spezifischen Zytokin-Mix polarisiert. Danach wurden die Zellen für die klonale Expansion geteilt und die Hälfte des Wells auf eine neue Platte ohne α CD3 umgesetzt, wieder mit frischem Medium + IL-2 auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und für weitere 3 Tage kultiviert. Bei diesem Versuchsansatz erfolgte die Zugabe des CSE erst nach 3 Tagen Polarisation, indem das CSE dem neu zugesetztem Medium beigemischt wurde. An Tag 6 wurden mittels spezifischer intrazellulärer Marker die relative Zellzahl und die MFI der einzelnen Th Subpopulationen (Th1/ Th2/ Th17 und Treg) bestimmt.

Durch die späte Gabe von CSE wurden vorzugsweise differenzierte Th17 Zellen und Tregs stabilisiert, das zeigte sich anhand der durch CSE gesteigerten relativen Zellzahlen dieser Populationen (siehe Abb. 43), was im Kontrast zu den Veränderungen der relativen Zellzahlen durch anfängliches Gabe von CSE steht (siehe Abb. 20). Auf die relative MFI hatte CSE bei allen Th Subpopulationen keinen signifikanten Einfluss. Im Gegensatz zur frühen Gabe von CSE (siehe Abb. 20) wurde die relative Zellzahl der IFN γ + Zellen durch CSE in diesem Versuchsansatz gehemmt (siehe Abb. 43). Ebenso wurden durch 2 % CSE weniger IL-4+ Zellen detektiert (siehe Abb. 43), welche durch anfängliche Gabe von CSE in ihrer Expansion nicht beeinflusst waren (siehe Abb. 20).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CSE insgesamt nur schwache Effekte auf bereits differenzierte Th Subpopulationen ausübt. Wobei die Th17 und Tregs Zellen durch den Effekt von CSE stabilisiert wurden und die Th1 und Th2 Zellen durch die Inkubation mit CSE eher leicht gehemmt wurden.

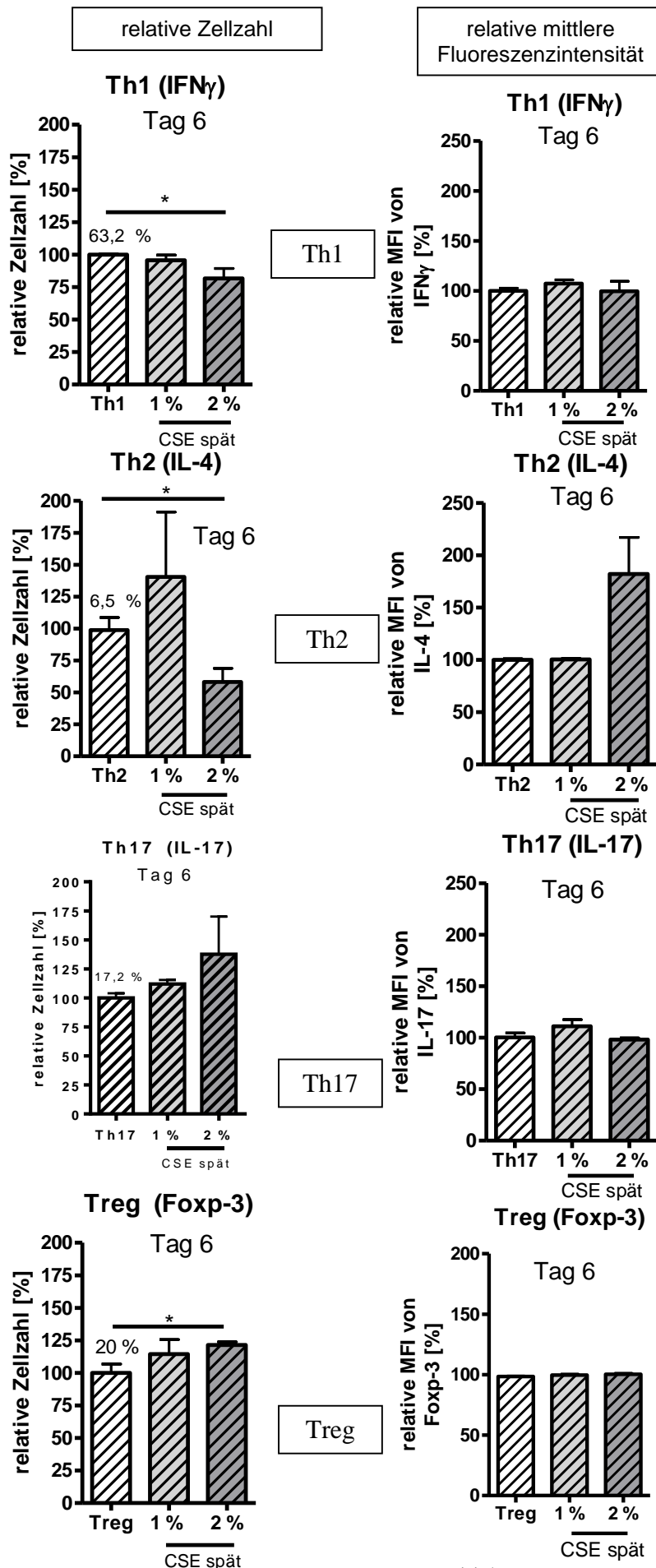


Abb. 43: Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker verschiedener ausdifferenzierter Th Subtypen
Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spez. Zytokin-Mix für Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 ohne CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse der intrazellulären Marker erfolgte an Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert und nach Fixierung mit 2 % PFA für die jeweiligen Marker für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind die relativen Zellzahlen und die MFI des prozentualen Anteiles des jeweiligen Th Subtyps im Vergleich zur Mediumkontrolle als Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05

3.2 Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen

Die Übertragbarkeit der *in vitro* Beobachtungen wurde anhand eines murinen Rauchmodells *in vivo* überprüft. Hierfür wurde ein bereits etabliertes chronisches Rauchmodell der Maus von unseren Kooperationspartnern in Gießen (AG Weißmann) verwendet (siehe 2.2.3).

3.2.1 Einfluss chronischer Rauchexposition auf den Lungen-Phänotyp anhand eines Mausmodells

Um die *in vitro* ermittelten Ergebnisse mit den Ergebnissen aus dem murinen chronischen Rauchmodell vergleichen zu können, musste zunächst überprüft werden ob das verwendete chronische Rauchmodell mit einer Rauchexpositionszeit von 2 bzw. 5 Monaten schon einen dem gut beschriebenen chronischen Rauchmodell aus Gießen vergleichbaren Lungen-Phänotypen mit Emphysembildung induzieren konnte.

Durch längere Rauchexposition über 5 Monate zeigten die Tiere eine signifikante Abnahme des Körpergewichts (siehe Abb. 44A). Die Messungen der Lungenfunktion zeigte nach 5 Monaten Rauchexposition noch unveränderte Werte in der Compliance (Maß für die Dehnbarkeit der Lunge) und lediglich einen Trend zur Rauchexpositionszeit-abhängigen Verschlechterung des Atemwegswiderstandes (*resistance*) (siehe Abb. 44B). Dagegen konnte anhand der histologischen Lungenschnitte eine deutliche Rauchexpositionszeit-abhängige Emphysem-Bildung gezeigt werden (siehe Abb. 44C).

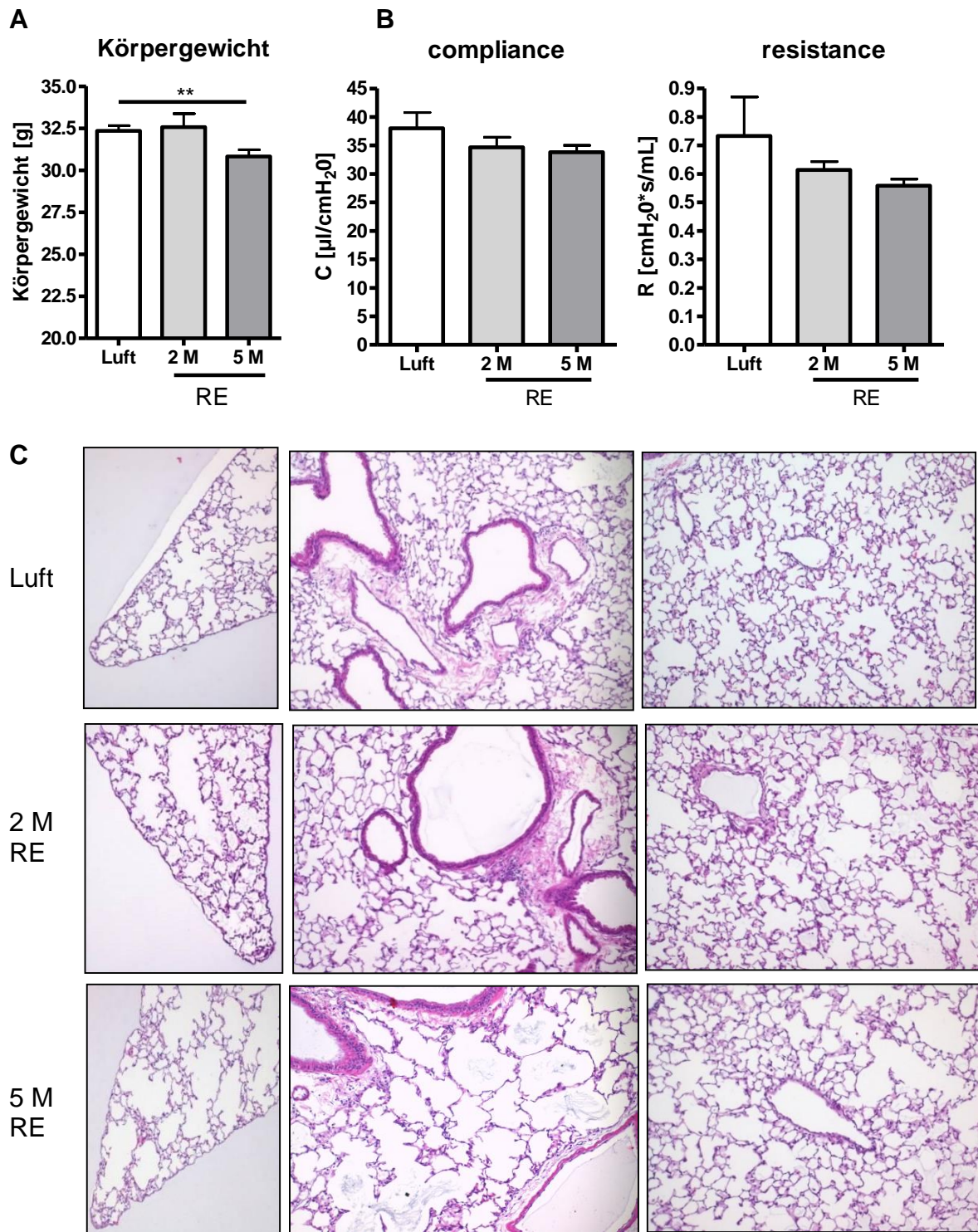


Abb. 44: Phänotyp nach chronischer Rauchexposition (RE)

6 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden für 2 bzw. 5 Monate (M) für 6 h/Tag für 5 Tage in der Woche einer Rauchexposition (RE) von 140 mg/m³ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Tiere, die während der gesamten Versuchszeit normaler Tierstallluft (Luft) ausgesetzt waren (siehe 2.2.3.). (A) 24 h nach der letzten RE wurden die Tiere gewogen. (B) Mittels invasiver Lungenfunktionsmessung wurden der Atemwegswiderstand (R) und die Compliance (C) der Lungen gemessen (siehe 2.2.7). (C) Repräsentative HE-Färbungen (x100) in Lungenschnitten (siehe 2.2.7). Gezeigt sind (A/B) Mittelwerte \pm SEM von n=8

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine längere Rauchexposition, wie schon von M. Seimetz (AG Prof. Weißmann, Gießen) beschrieben (Seimetz et al. 2011), zur Bildung eines Lungenemphysems führt. In dem von ihm beschriebenen Rauchmodell konnten erst in der späten chronischen Phase, ab 8 Monaten Rauchexposition, signifikante Steigerungen in der Compliance und Abnahmen des Atemwegswiderstandes gezeigt werden. Das erklärt unsere unveränderten Compliance Werte nach 5 Monaten Rauchexposition. Das Rauch-Modell zeigte somit einen eindeutigen Trend in Richtung der erwarteten Lungenfunktionswerte und histologisch eine deutliche Emphysem-Bildung und wurde für weitere Untersuchungen herangezogen. Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) der behandelten Tiere wurde auf die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation untersucht.

Rauchexposition hatte keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten in der BAL. Auch der Anteil an Makrophagen wurde durch die RE nicht beeinflusst. Allerdings wurde die Anzahl der Lymphozyten in der BAL durch Rauchexposition mit zunehmender Studiendauer gesteigert mit annähernd signifikanten Werten ($p = 0,055$) nach 5 Monaten. Ein signifikanter Influx von neutrophilen Granulozyten in der BAL konnte nur nach der längeren Rauchexposition von 5 Monaten gezeigt werden (siehe Abb. 45).

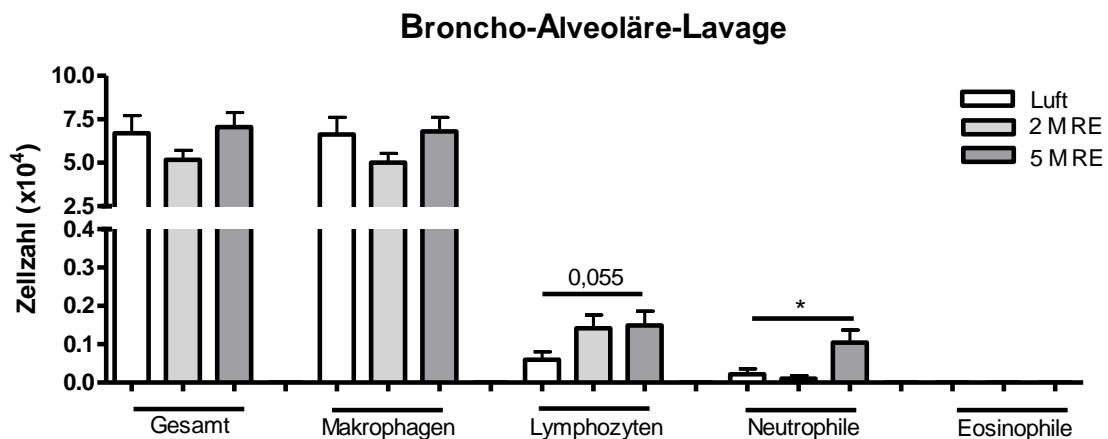


Abb. 45: Leukozyten in der broncho-alveolären Lavage (BAL) nach chronischer RE
6 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden für 2 bzw. 5 Monate (M) für 6h/Tag für 5 Tage in der Woche einer Rauchexposition (RE) von 140 mg/m³ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Tiere, die während der gesamten Versuchszeit normaler Luft ausgesetzt waren (siehe 2.2.3). Die BAL wurde nach der invasiven Lungenfunktionsmessung durchgeführt (siehe 2.2.7). Die Differenzierung erfolgte nach morphologischen Kriterien. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=8 Tieren / Gruppe, * $p < 0,05$

3.2.2 Einfluss chronischer Rauchexposition auf verschiedene Th-Subgruppen

Die Exposition mit Rauch hatte zudem einen Einfluss auf die Anzahl der CD3+ Lymphozyten und deren Untergruppen in den drainierenden Lymphknoten, dem Lungengewebe und der Milz. In den Lymphknoten aus der Lungenperipherie wurden nach 5 Monaten Rauchexposition signifikant mehr CD3+ Lymphozyten nachgewiesen, wobei hier sowohl mehr CD4+ als auch mehr CD8+ Zellen detektiert wurden. Im Lungenhomogenat konnte ein steigender Einfluss auf die Lymphozyten schon nach 2 Monaten Rauchexposition gesehen werden (siehe Abb. 46). Auf die Anzahl der Lymphozyten in der Milz hatte die Rauchexposition keinen Einfluss (Ergebnisse nicht gezeigt).

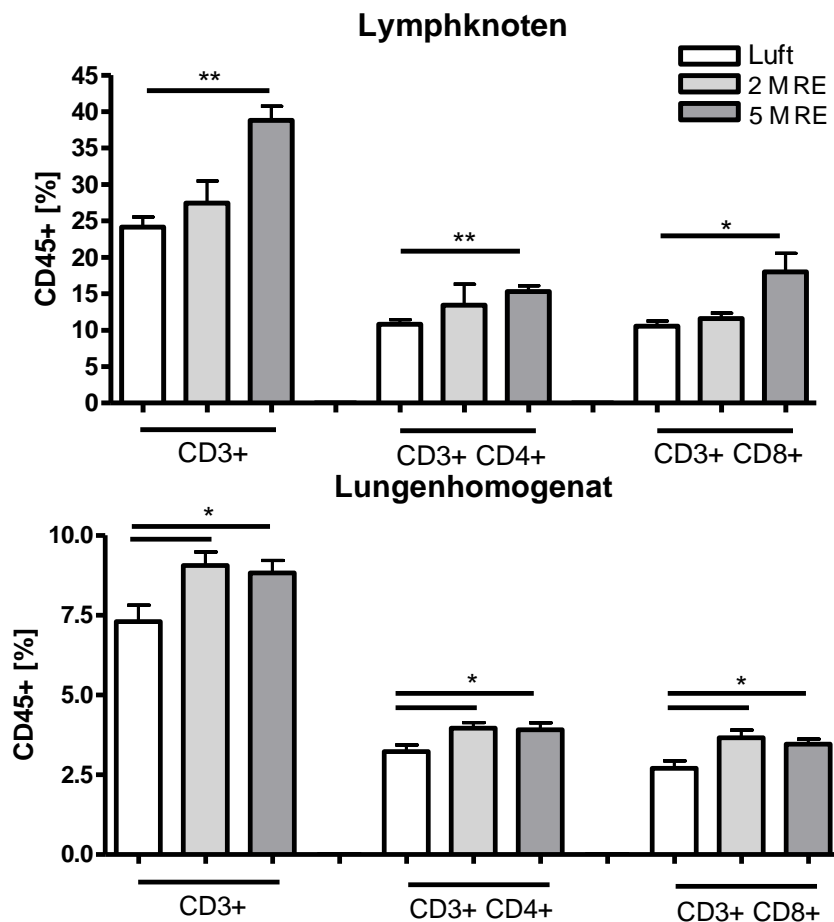
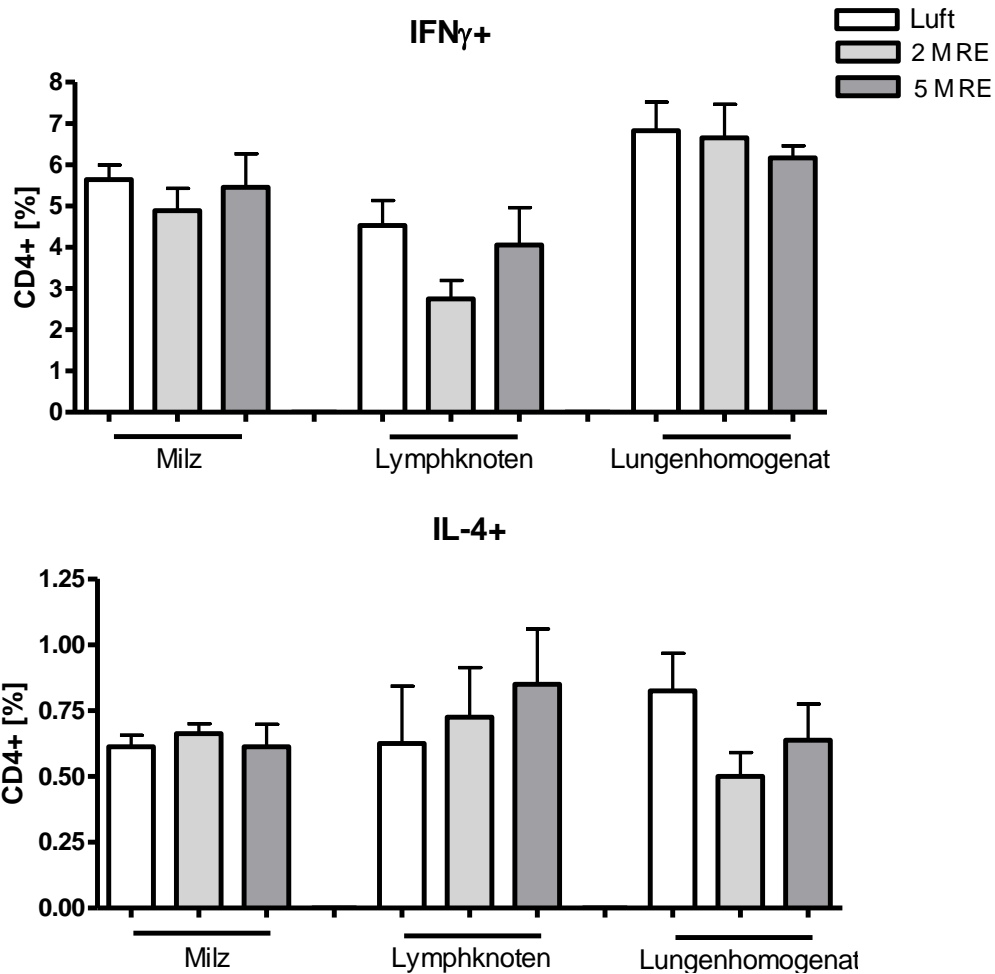


Abb. 46: Einfluss chronischer RE auf die Verteilung der Lymphozyten-Untergruppen
6 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden für 2 bzw. 5 Monate (M) für 6h/Tag für 5 Tage in der Woche einer Rauchexposition (RE) von 140 mg/m³ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Tiere, die während der gesamten Versuchszeit normaler Luft ausgesetzt waren (siehe 2.2.3). Die isolierten Lymphknoten und das aufbereitete Lungenhomogenat wurden mittels Oberflächenfärbung (CD45-PerCp; CD3-PE; CD4-APC und CD8a-FITC) am FACS analysiert (siehe 2.2.7 und 2.2.8). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=8 Tieren / Gruppe, *p<0,05 und **p<0,01

Aufgrund der signifikanten Änderungen der Zellzahlen stellte sich nachfolgend die Frage, ob die Rauchexposition nicht nur die erhöhte Zellzahl der CD4⁺ Zellen in den peripheren Lymphknoten und dem Lungenhomogenat hervorruft, sondern auch eine veränderte Zusammensetzung der einzelnen Th-Subgruppen bedingt.

Die Frequenz IFN γ ⁺ Th1 Zellen wurden durch verschiedene Rauchexpositionszeiten in Milz, Lymphknoten und Lungenhomogenat (siehe Abb. 47A) nicht signifikant beeinflusst, allerdings konnte für Milz und Lungenhomogenat ein leichter Trend für eine gesteigerte mittlere Fluoreszenzintensität in den Gruppen mit Rauchexposition ermittelt werden, was für eine gesteigerte Aktivität dieser Zellen spricht (siehe Abb. 47B). Anhand der *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass CSE die Differenzierung der Th1 Zellen induziert, wobei die Proliferation verzögert wurde (siehe Abb. 20). Damit stimmen die beobachteten Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Versuche überein. Auch die Zellzahl der IL-4⁺ Th2 Zellen in Milz, Lymphknoten und Lungenhomogenat bleibt, analog zu den *in vitro* Ergebnissen (siehe Abb. 20), *in vivo* durch Rauch unbeeinflusst (siehe Abb. 47A).

A



B

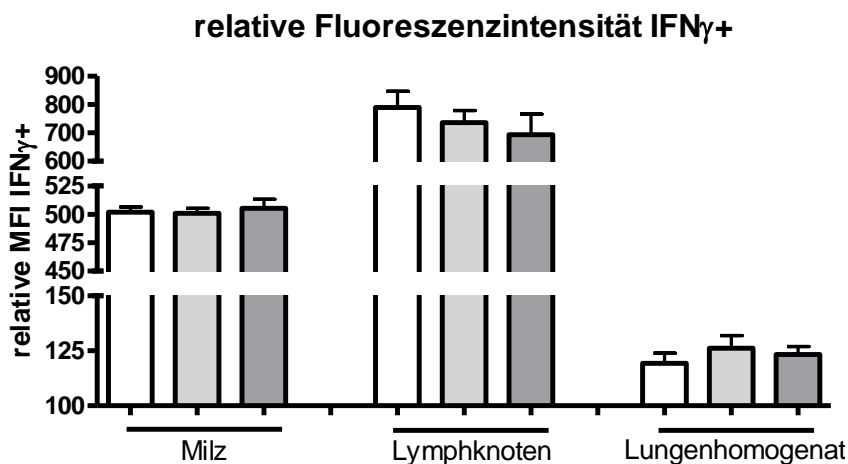


Abb. 47: Einfluss chronischer RE auf die Frequenz IFN γ – bzw. IL-4 – positiver T-Zellen sekretierter Zytokine

6 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden für 2 bzw. 5 Monate (M) für 6h/Tag für 5 Tage in der Woche einer Rauchexposition (RE) von 140 mg/m³ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Tiere, die der gesamten Versuchszeit normaler Luft ausgesetzt waren (siehe 2.2.3). Die isolierten Lymphknoten, Milz und das aufbereitete Lungenhomogenat wurden mittels Intrazellulärfärbung (CD4-APC; IFN γ -PE und FITC; IL-4-PE) am FACS analysiert (siehe 2.2.7 und 2.2.8). Gezeigt sind (A) prozentualer Anteil von IFN γ und IL-4 CD4+ Zellen, sowie (B) die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von IFN γ Zellen als Mittelwerte \pm SEM von n=8 Tieren / Gruppe.

Die relative Anzahl der Foxp-3+ Tregs in der Milz war nach einer RE von 5 Monaten signifikant reduziert (siehe Abb. 48). Das entspricht den *in vitro* Daten, die zeigten, dass CSE die Differenzierung von Tregs signifikant inhibiert (siehe Abb. 20). In den peripheren Lymphknoten zeigte sich dagegen kein Effekt der Rauchexposition auf die Anzahl der Foxp-3+ Tregs. Allerdings führte eine kurze Rauchexposition von 2 Monaten zu einer transienten signifikanten Steigerung der Anzahl an Tregs in der Lunge, welche nach 5 Monaten nicht mehr zu sehen war (siehe Abb. 48). Diese Zunahme an Foxp-3+ Tregs in dem Lungenhomogenat korreliert mit dem Ergebnis der *in vitro* Versuche in ausdifferenzierten Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass vorhandene Tregs durch die Einwirkung von CSE im Gegensatz zu Tregs, die mit CSE während der Differenzierung behandelt wurden (siehe Abb. 20), stabilisiert werden (siehe Abb. 43). Der Anteil an Th17 Zellen in der Milz nahm mit zunehmender Rauchexpositionzeit ab und war nach 5 Monaten signifikant erniedrigt. Allerdings zeigte sich für die Lymphknoten und das Lungenhomogenat ein entgegengesetztes Bild, da in diesen Kompartimenten die Anzahl der IL-17A+ Th17 Zellen nach 5 Monaten Rauchexposition signifikant erhöht war (siehe Abb. 48). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass CSE die Differenzierung von Th17 Zellen zunächst nicht beeinflusst, aber nach 6 Tagen in Kultur signifikant weniger Th17 Zellen nachzuweisen sind (siehe Abb. 20). Dagegen wurde in bereits ausdifferenzierten Th17 Zellen durch die Einwirkung von CSE eine Zunahme der Th17 Population induziert (siehe Abb. 43). 5 Monate RE bewirkten noch keine Änderung in der Anzahl von IL-9+ Th9 Zellen in der Milz, allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der IL-9+ Population in den Lymphknoten und im Lungengewebe gezeigt werden (siehe Abb. 52). Dieses Ergebnis reflektiert die *in vitro* Beobachtungen, dass CSE die Zellzahl der IL-9+ Th2 und Th9 Zellen signifikant erhöht (siehe Abb. 35 und 37).

Die Daten des *in vivo* Experimentes spiegeln im Wesentlichen die Befunde der *in vitro* Untersuchungen wieder und sind ein erster Hinweis für die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation.

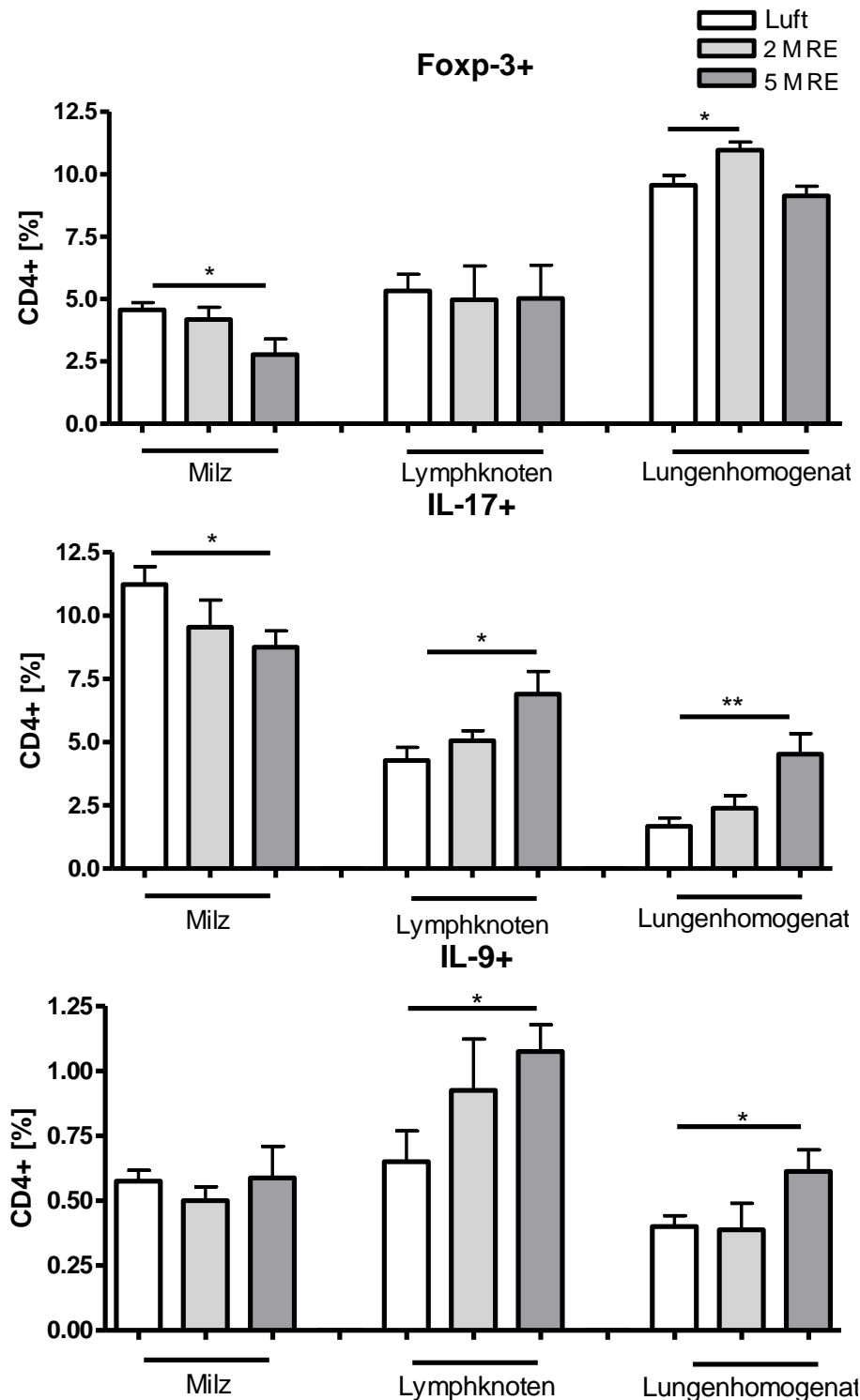


Abb. 48: Einfluss chronischer RE auf die Frequenz von Treg, Th17 und IL-9 polarisierten Zellen

6 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse wurden für 2 bzw. 5 Monate (M) für 6h/Tag für 5 Tage in der Woche einer Rauchexposition (RE) von 140 mg/m³ ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Tiere, die der gesamten Versuchszeit normaler Luft ausgesetzt waren (siehe 2.2.3). Die isolierten Lymphknoten, Milz und das aufbereitete Lungenhomogenat wurden mittels Intrazellulärfärbung (CD4-APC; IL-17-PE und FITC; Foxp-3-PE und IL-9-PE) am FACS analysiert (siehe 2.2.7 und 2.2.8). Gezeigt ist der prozentuale Anteil von Foxp-3+, IL-17+ und IL-9+ CD4+ Zellen als Mittelwerte \pm SEM von n=8 Tieren / Gruppe, *p<0,05 und **p<0,01

4 Diskussion

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist durch chronische Entzündungsreaktionen in den kleinen Atemwegen, verstärkter Mukus-Produktion und einer Emphysembildung charakterisiert. Die Erkrankung ist eine schwerwiegende und global auftretende Erkrankung, die sich als eine „Volkskrankheit“ bezeichnen lässt (Barnes 2007), die in den nächsten Jahren in der Todesursachenstatistik weiter ansteigen wird. Das Rauchen von Zigaretten stellt einen der Hauptrisikofaktoren dar (MacNee und Rahman 2001; Pauwels und Rabe 2004). Obwohl die übermäßige Entzündungsreaktion eines der Hauptmerkmale der COPD ist, ist die Beteiligung der inflammatorischen Komponente in der Lunge an der Pathophysiologie und Progression einer COPD und der modifizierende Effekt von Zigarettenrauch auf das inflammatorische Geschehen bisher unzureichend erforscht (Barnes 2009). Derzeit gibt es nur Symptom-lindernde und keine kurativen Therapieansätze für COPD Patienten (Barnes 2013). Daher ist die Erforschung neuer Therapieansätze unabdingbar. Hierfür müssen die der COPD Pathogenese zugrunde liegenden molekularbiologischen und immunologischen Mechanismen weiter erforscht und entschlüsselt werden. Der derzeitige Stand der Forschung zeigt, dass insbesondere Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten an der chronischen Entzündung der COPD beteiligt sind (Barnes 2003). Die genaue Rolle der CD4+ Zellen in Hinblick auf die rauchbedingten Änderungen während der Differenzierung und in der Zytokinproduktion ist bis heute noch nicht verstanden und unzureichend erforscht.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Zigarettenrauch auf verschiedene Stadien der Differenzierung unterschiedlicher Th-Subgruppen untersucht.

Zunächst wurden die Kultivierungsbedingungen mit Zigarettenrauch-verstärktem Medium (CSE) und der Einfluss von CSE auf die Proliferation unterschiedlicher Th-Subgruppen *in vitro* analysiert.

Während der *in vitro* Kultivierung von naiven murinen CD4+ Zellen wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Toxizität von CSE festgestellt, die allerdings

nach 48 h Kultivierung stagnierte. Für alle folgenden Versuche wurden zwei Konzentrationen von CSE gewählt. Zum einen die Konzentration von 1 % CSE, da bei dieser Konzentration erste, milde Einflüsse von CSE auf die Vitalität der Zellen nachweisbar waren. Zum anderen wurde die Konzentration von 2 % CSE verwendet, da hier nach 72 h der halbmaximale toxische Effekt nachgewiesen wurde und somit ein größerer Effekt von CSE zu erwarten war. Mit diesen CSE-Konzentrationen wurde anschließend der Effekt auf die Proliferation von naïven T-Zellen, Th1, Th2, Th9, Th17 und Tregs untersucht. Diese Versuche zeigten, dass mit steigender CSE Konzentration die Proliferation aller Th-Subtypen signifikant abnimmt. Diese Proliferationsabnahme erwies sich allerdings als eine CSE-konzentrationsabhängige transiente Proliferationsverzögerung und nicht als anhaltende generelle Proliferationshemmung, da nach 6 Tagen in Kultur die Proliferation der mit CSE kultivierten Zellen mit denen der CSE-unbehandelten Zellen vergleichbar war.

Bisherige Forschungsarbeiten über den Effekt von CSE beschränkten sich im Wesentlichen auf Lungenepithelzellen, Dendritische Zellen und Makrophagen und weniger auf die CD4⁺ Zellen (Chen et al. 2014; Metcalfe et al. 2014; Mortaz et al. 2010; Lin et al. 2014a). Zigarettenrauch enthält reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), welche oxidativen Stress auslösen, wodurch die Zahl von apoptotischen und nekrotischen Zellen in der Lunge steigt und somit eine chronische Entzündung in der Lunge induziert bzw. aufrechterhalten wird. Kürzlich wurde anhand einer humanen bronchialen Epithellinie (BEAS-2B) gezeigt, dass CSE durch die Anwesenheit von ROS Apoptose vermittelt (Lin et al. 2014b). Diese durch CSE bedingte Toxizität konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse auch für T-Zellen bestätigt werden. Auch die Gruppe von Hernandez et al. konnte einen direkten Effekt von CSE auf primäre aktivierte T-Zellen zeigen. Dabei wurde die Induktion von zellulärer Apoptose als Ursache für eine CSE-dosisabhängig abnehmende Proliferation nachgewiesen (Hernandez et al. 2013). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass CSE in T-Zellen und bronchialen Epithelzellen Mechanismen beeinflusst, die an der Abwehr von infektiösen Agentien beteiligt sind. Durch die Inkubation der T-Zellen mit 0,5 – 1 % CSE zeigte sich eine signifikant reduzierte T-Zell Aktivierung und Proliferation sowie eine Reduktion der Expression des zytotoxischen Proteins Granzyme B (Glader et al. 2006). In dieser Arbeit wurde

ebenfalls eine CSE-dosisabhängig verminderte Proliferation verschiedener T-Zell Subtypen gezeigt. Mit den in dieser Arbeit vorgelegten Daten konnte erstmals aufgezeigt werden, dass es sich bei dem CSE Effekt nur um eine transiente Proliferationsverzögerung und nicht um eine generalisierte Proliferationsinhibition handelt.

Die durch Zigarettenrauch induzierte Proliferationsverzögerung und Beeinflussung der T-Zell-Zytotoxizität könnte zu einer Beeinträchtigung der Immunabwehr bei Atemwegsinfektionen führen und somit an der Ausbildung infektbedingter Exazerbationen bei COPD-Patienten beteiligt sein.

Die verminderte Effektorfunktion könnte den Zusammenhang zwischen der relativ hohen Zahl von T-Zellen, die in den Lungen von COPD Patienten und Rauchern detektiert wurden (Ekberg-Jansson et al. 2000; O'Shaughnessy et al. 1997; Saetta et al. 1998), und der hohen Frequenz von Atemwegsinfekten und reduzierter Abwehr gegen virale Erkrankungen (Seemungal et al. 2001; Marcy und Merrill 1987; Razani-Boroujerdi et al. 2004) erklären. Außerdem wurde gezeigt, dass COPD-Patienten ein abgeschwächtes Immunsystem aufweisen und dieses mit der Zeit, im Zuge der chronischen Inflammation, erhalten bleibt und sich die Zusammensetzung der Th Subtypen dauerhaft wandelt (Chung und Adcock 2008). Zudem wurde gezeigt, dass respiratorische Entzündungen zu einer schwereren, längeren infektbedingten Exazerbation in COPD Patienten führt (Dai et al. 2015).

Für die in dieser Arbeit vorliegenden grundlegenden Untersuchungen des Effekts von Zigarettenrauch-versetztem Medium (CSE) auf die Differenzierung unterschiedlicher Th-Subgruppen wurden drei verschiedene Grundfragestellungen untersucht: (1) Einfluss von CSE auf naïve CD4⁺ Zellen unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen (*in vitro*) (2) Einfluss von CSE während der Differenzierung verschiedener CD4⁺ Subpopulationen (*in vitro*) und (3) Einfluss von CSE auf bereits differenzierte CD4⁺ Subpopulationen (*in vitro* und *ex vivo*). Dafür wird in der 1. Phase der Differenzierung von „Polarisierung“ gesprochen, der sich dann unter dem weiterführenden Einfluss von einer unspezifischen Stimulation in Gegenwart von IL-2 die „Expansionsphase“ anschließt. Für Fragestellung (3) wird von „*in vitro*“ gesprochen wenn die CD4⁺ Subpopulationen aus naïven CD4⁺ Zellen *in vitro*

für die weiteren Untersuchungen differenziert wurden und von „*ex vivo*“ wenn bereits *in vivo* differenzierte CD4⁺ Zellen untersucht wurden. Im Anschluss wurde die *in vivo* Relevanz der *in vitro* beobachteten Ergebnisse an Hand eines murinen chronischen Rauchmodells nachgewiesen.

In der nachfolgenden Diskussion werden die untersuchten Zelltypen zunächst separat betrachtet. In diesen Passagen werden jeweils alle oben aufgeführten Fragestellungen (*in vitro/ ex vivo und in vivo*) im Kontext zueinander diskutiert. Im Anschluss daran erfolgt die Betrachtung des Lymphozyten Phänotyps im chronischen Rauchmodell und die Diskussion über lymphoide B-Zell Follikel und autoimmune Prozesse, welche in der Pathogenese der COPD vermutlich eine Rolle spielen.

Undifferenzierte naïve CD4⁺ Zellen

Dieser Zelltyp wurde nur im Hinblick auf die erste Fragestellung, welchen Einfluss CSE auf naïve CD4⁺ Zellen unter nicht polarisierenden Th0 Bedingungen hat, analysiert. Die initiale Vermutung, dass CSE die Polarisierung unterschiedlicher Th Subtypen aus naïven CD4 Zellen induziert, konnte in hoch aufgereinigten naïven T-Zell-Populationen nicht verifiziert werden. Somit hat CSE keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung von naïven CD4 Zellen. Stattdessen zeigte sich, dass die nach der unvollständigen Aufreinigung (~20 % bereits vorstimulierte Zellen) verbliebenen unterschiedlich ausdifferenzierten T-Zellen durch CSE beeinflusst wurden. Daher geben die Daten Aufschluss über den Einfluss von CSE auf bereits *in vivo* ausdifferenzierte CD4⁺ Subtypen analog zu der *in vitro* Analyse unter Fragestellung (3). Folglich werden diese Beobachtungen mit den *in vitro* Daten innerhalb der Passagen zu den einzelnen Th Subtypen als *ex vivo* Daten diskutiert.

Th1 Zellen

Die *in vitro* Daten zeigen, dass CSE während der Polarisation die Proliferation der Th1 (IFN γ ⁺) Zellen verzögerte, gleichzeitig aber die Differenzierung mit einer gesteigerten Aktivität der IFN γ ⁺ Produktion förderte. Dies zeigte sich in einer erhöhten MFI nach intrazellulärer IFN γ -Färbung nach drei Tagen Polarisation, bei signifikant weniger polarisierten Th1 Zellen. Die erhöhte

Aktivität konnte mit einer signifikant gesteigerten relativen Anzahl an IFN γ sekretierenden Zellen, sowie signifikant erhöhten Mengen von IFN γ in Überständen von restimulierten Th1 Zellen bestätigt werden. Für die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors Tbet zeigte sich für den gewählten Probenzeitpunkt von zwei Tagen mit CSE polarisierten Zellen kein Unterschied. Auf Proteinebene konnte eine geringere Menge an Tbet nachgewiesen werden, was mit der verminderten Anzahl an Th1 Zellen nach 3 Tagen Polarisation korreliert. Nach 6 Tagen Th1 Differenzierung hatten sich unter dem Einfluss von CSE mehr IFN γ + Zellen entwickelt. Allerdings zeigte CSE auf bereits differenzierte Th1 Zellen an Tag 6 *in vitro* einen leicht inhibierenden Effekt während der klonalen Expansion von 3 Tagen. Die *ex vivo* Daten spiegeln die *in vitro* detektierte CSE bedingte steigernde Wirkung auf die Expansion von IFN γ + Th1 Zellen wider, da hier ebenfalls nach 3 Tagen Expansion zunächst noch kein Unterschied zu detektieren war und nach einer längeren Expansionszeit von 6 Tagen ein CSE bedingter Anstieg von IFN γ + Zellen nachgewiesen wurde. *Ex vivo* wurde nach 2 Tagen Expansion durch CSE eine gesteigerte Expression der mRNA des Transkriptionsfaktors Tbet detektiert, welche die vermehrte Induktion der Th1 Population an Tag 6 erklärt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der durch CSE unveränderten relativen Genexpression von Tbet während der Th1 Differenzierung *in vitro*. Dies lässt sich durch die im Vergleich *in vitro/ex vivo* an Tag 3 detektierten unterschiedlich verteilten Th1 Populationen erklären. *Ex vivo* bestand zwischen den einzelnen Gruppen an Tag 3, wenn überhaupt, eher ein Trend zu einer erhöhten Frequenz an Th1 Zellen und *in vitro* reduzierte CSE während der Th1 Polarisierung signifikant die Th1 Population. Die Ergebnisse des Proteinnachweises für Tbet an Tag 3 zeigten auch *ex vivo* einen CSE induzierten Rückgang. Die Ergebnisse der mRNA Expression und des Proteinnachweises sind kontrovers. Das könnte einerseits an unterschiedlichen Kinetiken von mRNA und Proteinexpression liegen oder andererseits könnten die noch vorhandenen Restpopulationen in den analysierten Proben einen Einfluss auf die Sensitivität der Nachweismethode ausüben. Im *in vivo* Rauchmodell zeigte sich, dass die Anzahl der IFN γ + Th1 Zellen in der Lunge, Milz und Lymphknoten nicht beeinflusst wurde, aber die Aktivität dieser Zellen durch die Rauchexposition in Milz und Lunge zunahm. Diese Daten korrelieren mit den *in vitro* und *ex vivo*

beobachteten Ergebnissen, dass die Aktivität von Th1 Zellen durch Rauch gesteigert wird.

In COPD Patienten spricht man von einer Th1-Typ Inflammation, da hier durch die Tc1 und Th1 Zellen vermehrt TNF- α und IFN γ sezerniert und somit die Entzündung aufrechterhalten wird (Barnes 2008). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass in COPD Patienten vorwiegend Tc1 / Th1 Zellen aktiviert werden, indem STAT 4 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) aktiviert und IFN γ produziert wird (Di Stefano et al. 2004). Eine aktuelle Studie zeigt, dass Th1 Zellen und das durch sie gebildete IL-2 maßgeblich an der chronischen Aufrechterhaltung der Entzündungsprozesse in COPD Patienten verantwortlich sind, da durch einen Defekt im TLR4 Pathway der Th1 Zellen die IL-2 abhängige CD4+ Proliferation in COPD supprimiert werden konnte (Knobloch et al. 2015). Eine andere Studie konnte zeigen, dass erhöhte IFN γ Spiegel in aktiven Rauchern mit der Emphysementwicklung korrelieren (Bhavani et al. 2015). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in Mäusen und Menschen durch die Einwirkung von Agrarstaub die T-Zell Polarisation in Richtung Th1 und Th17 getrieben wird (Robbe 2014). Dies zeigt, dass noch nicht analysierte Komponenten im Staub beziehungsweise Zigarettenrauch für die Zusammensetzung der Th Subtypen und somit für das Immunsystem eine maßgebliche Rolle spielen könnten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun erstmals den direkten Effekt von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von Th1 Zellen und die damit verbundene Ausschüttung von IFN γ . Da die gesteigerte IFN γ Sekretion den Entzündungsprozess aufrechterhält und so zur Pathogenese der COPD beiträgt, ist ein direkter Zusammenhang von Zigarettenrauch und der Induktion und Aufrechterhaltung von COPD erstmals nachgewiesen worden.

Th2 Zellen

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Th2 assoziierte Zytokine durch die Einwirkung von Rauch-Komponenten vermindert produziert werden, da die Sekretion der Th2 spezifischen Zytokine IL-5 und IL-13 durch CSE deutlich inhibiert wurde. Auch die Sekretion von IL-4 konnte mit einer höheren CSE Konzentration vermindert werden. In Hinsicht auf die durchflusszytometrisch bestimmte Population IL-4+ Zellen zeigte sich allerdings nach 6 Tagen

Kultivierung kein Unterschied durch die Einwirkung von CSE während der Differenzierung *in vitro*.

Die relative Genexpression des Th2 spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 zeigte nach 2 Tagen Polarisation durch CSE keine Unterschiede. Allerdings konnte auf Proteinebene nach 3 Tagen Polarisation eine leichte Abnahme von GATA-3 durch 2 % CSE gezeigt werden. Somit wurde nachgewiesen, dass CSE mit steigender Konzentration einen inhibierenden Einfluss auf die Expression von GATA-3 und nachfolgender Produktion Th2 spezifischer Zytokine hat.

Auf bereits differenzierte Th2 Zellen wirkt CSE *in vitro* mit steigender CSE Konzentration ebenfalls inhibierend auf die Expansion der IL-4+ Th2 Zellen.

Für die IL-4+ Th2 Zellen zeigte sich *ex vivo* kein deutlicher Trend für den Einfluss von CSE. Die Untersuchungen des Th2 spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 zeigten in der Expression der mRNA und auf Proteinebene, bei den mit 2 % CSE kultivierten Zellen auch hier einen signifikanten Rückgang von GATA-3. Das deutet darauf hin, dass die Th2 Differenzierung durch CSE auch unter diesen Bedingungen eingeschränkt wird. *In vivo* konnte kein Unterschied in der Anzahl von IL-4+ Th2 Zellen in der Milz, Lymphknoten oder Lunge nach chronischer Rauchexposition gesehen werden. Die vorliegenden Daten zeigen außerdem, dass Th2 polarisierte Zellen durch CSE signifikant weniger IL-10 sekretieren.

Die Rolle der Th2 Zellen in der Pathogenese der COPD wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass die Expression von IL-4 in den CD8+ Zellen (Tc2) in der BAL erhöht ist (Kemeny et al. 1999; Barczyk et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden nur die CD4+ Th2 Zellen untersucht und somit kann dieses Ergebnis nicht belegt werden. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Expression eines anderen Th2 Zytokins, IL-13, in Patienten mit einer schweren COPD vermindert ist (Boutten et al. 2004). Dies korreliert mit den *in vitro* detektierten erniedrigten sekretierten Mengen an IL-13 in Th2 Zellen durch CSE. Humane Studienergebnisse zeigten einerseits eine verminderte Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Sputum von COPD Patienten (Takanashi et al. 1999) und andererseits eine deutlich geminderte IL-10 Freisetzung im Lungenparenchym von COPD Patienten nach LPS Stimulierung, im Vergleich zu Lungen von Rauchern mit

normaler Lungenfunktion (Hackett et al. 2008). Die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse unterstützen diese Studienergebnisse.

Th17 Zellen

Obwohl CSE während der Polarisation nach 3 Tagen keinen Einfluss auf die Zellzahl der Th17 Zellen hatte, wurden erhöhte MFI Werte für intrazelluläre IL-17-Färbung nachgewiesen, was für eine höhere Aktivität der differenzierten Th17 Zellen unter CSE Einfluss spricht. Nach einer Restimulation dieser Zellen *in vitro* zeigte sich im ELISA und im Sekretion-Assay allerdings kein Unterschied in der freigesetzten Menge an IL-17A und in der Anzahl an IL-17A sekretierenden Zellen. Dies könnte daran liegen, dass für die Restimulation zwar eine vergleichbare Anzahl an Zellen eingesetzt wurde, aber der Anteil der differenzierten IL-17A+ Th17 Population in diesem Stimulationsansatz durch die vorhandenen Restpopulationen leicht schwankte und somit eine gesteigerte Aktivität nicht detektiert werden konnte. Allerdings zeigte die relative Genexpression des Th17 assoziierten Transkriptionsfaktors ROR γ t nach 2 Tagen Polarisation auch keinen CSE bedingten Unterschied, was eher dafür spricht, dass nach drei Tagen die IL-17A+ Population durch CSE nicht beeinflusst wurde.

Nach 6 Tagen Polarisation durch CSE nahm die Anzahl der IL-17A+ Th17 Zellen signifikant ab.

Im Gegensatz dazu hatte CSE auf bereits differenzierte Zellen eine steigernde Wirkung auf die relative Anzahl an IL-17A+ Th17 Zellen. Diese steigernde Wirkung konnte auch *ex vivo* durch die Gabe von CSE nach 3 Tagen Expansion anhand einer gesteigerten realtiven Anzahl von IL-17A+ Th17 Zellen und einer gesteigerten relativen Genexpression des Transkriptionsfaktors, ROR γ t, bestätigt werden.

Auch *in vivo* zeigten sich nach Rauchexposition über 5 Monate in den lungenperipheren Lymphknoten und in der Lunge erhöhte Zahlen an IL-17A+ Th17 Zellen. In der Milz wurden allerdings weniger IL-17A+ Zellen detektiert. Diese Beobachtung korreliert mit der *in vitro* Erkenntnis, dass Th17 Zellen durch Rauch-Komponenten in ihrer Differenzierung nach 6 Tagen inhibiert werden (systemisch in der Milz), aber schon vorhandene Th17 Zellen durch CSE stabilisiert oder sogar aktiviert wurden.

Bis jetzt ist noch sehr wenig über die Rolle der Th17 Zellen in der Pathogenese der COPD bekannt, aber die Level an IL-17A, dem prädominanten Zytokin der Th17 Zellen, sind im Sputum von COPD Patienten erhöht (Manel et al. 2008) und außerdem wurden erhöhte Level an Th17 Zellen in bronchialen Biopsien von COPD Patienten nachgewiesen (Di Stefano et al. 2009, Zhang et al. 2013). Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen die Beobachtungen einer verstärkten IL-17 Expression und bestärken den bisherigen Wissenstand mit der Annahme, dass Th17 Zellen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der COPD spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch-Komponenten einen direkten Einfluss auf die vermutlich an der Pathogenese beteiligten Th17 Zellen haben und somit für die erhöhten Spiegel an IL-17 mitverantwortlich sind.

Th17-Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression von IL-17, TNF- α , GM-CSF und IL-6. Für die Differenzierung von Th17-Zellen sind die Zytokine IL-6 und TGF- β essentiell, da sie den Th17 assoziierten Transkriptionsfaktor ROR γ t aktivieren (Weaver et al. 2007). In Granulozyten induziert IL-17 die Expression von GM-CSF, IL-8 und IL-6 und bewirkt so eine Aktivierung und Attraktion von neutrophilen Granulozyten und induziert eine verstärkte Bildung der Granulozyten (Granulozytopoese) (Stockinger und Veldhoen 2007). Des Weiteren induziert oder verstärkt IL-17 die Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren. Darunter zählen die Zytokine IL-1 und IL-6, sowie das pro-inflammatorische Prostaglandin PGE2 sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche in der Entstehung der COPD eine wichtige Rolle spielen (Papakonstantinou E et al. 2015). Aktuell konnte durch ein murines Rauchmodell gezeigt werden, dass IL-17 für die Entwicklung der pulmonalen Neutrophilie während einer durch Rauch aktivierten akuten Exazerbation erforderlich ist (Roos et al. 2015). Außerdem stimuliert IL-17 die Expression von MMPs in Osteoblasten und synovialen Fibroblasten (Agarwal 2008). Die pathogene Wirkung entfaltet das IL-17 teils synergistisch mit, aber unabhängig von TNF- α und IL-1 (Weaver et al. 2007; Stockinger und Veldhoen 2007).

Eine mögliche Erklärung für den durch Rauch induzierten Mechanismus für die veränderte Immunantwort in Richtung Th17 könnte die Aktivierung des Aryl hydrocarbon Rezeptors (AhR) sein. Zigarettenrauch enthält viele AhR Liganden

und aktiviert so AhR abhängige Transkriptionen (Martey et al. 2005), wobei Chen und Kollegen zeigen konnten, dass Ahr-defiziente Mäuse unfähig sind, Th17 Zellen zu generieren (Chen et al. 2011). Somit könnten die AhR Liganden im Zigarettenrauch eine Rolle in der Entwicklung der Th17 Zellen haben. Die Modulation der IL-17 Produktion bei der COPD könnte ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein.

Tregs

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch einen drastisch inhibierenden Effekt auf die Differenzierung von Foxp-3⁺ Tregs hat. *In vitro* haben sich durch die Gabe von CSE während der Polarisation nur halb so viele Tregs entwickelt und die relative Genexpression des Transkriptionsfaktors Foxp-3 wurde durch 1 % CSE ebenfalls vermindert. Allerdings zeigte sich für 1 % CSE eine gesteigerte Sekretion des immunmodulierenden Zytokins TGF- β . Für 2 % CSE konnte ein Trend für eine verminderte relative Genexpression von Foxp-3 aufgezeigt werden. Die Sekretion von TGF- β zeigte bei 2 % keinen Unterschied. Dies könnte auf eine gesteigerte Aktivität der durch 2 % CSE verminderten Treg Population sprechen. Auf bereits differenzierte Tregs zeigte CSE allerdings einen stabilisierenden Effekt während der Expansionszeit. Dies konnte auch mit den *ex vivo* Daten bestätigt werden, da hier die Gabe von CSE nach 3 Tagen Stimulation zu einer gesteigerten Anzahl von Foxp-3⁺ Zellen und zu einer gesteigerten relativen Genexpression des Transkriptionsfaktors Foxp-3 führte.

In vivo zeigte sich durch die chronische Rauchexposition ein signifikanter Rückgang der Foxp-3⁺ Zellen in der Milz, was für eine systemische Minderung der Tregs in diesen Tieren spricht. In den peripheren Lymphknoten konnte dagegen keine Änderung beobachtet werden. In der Lunge wurde nach einer kürzeren Rauchexpositionszeit von 2 Monaten ein Anstieg der Foxp-3⁺ Zellen nachgewiesen, wobei nach 5 Monaten ein Trend für einen Rückgang der Foxp-3⁺ Zellen zu sehen war. Die kurzfristige Steigerung der Foxp-3⁺ Zellzahl in der Lunge korrelierte mit den *in vitro* Ergebnissen.

Die sich aktuell häufenden Anzeichen, dass Autoimmunprozesse zur Entwicklung einer COPD beitragen, bestärken die Vermutung, dass Tregs im Zusammenhang der COPD Pathogenese eine Rolle spielen könnten, da diese

maßgeblich an der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Raucher mit COPD und Emphysem haben im Vergleich zur Kontrollgruppe, Raucher ohne COPD, signifikant weniger Tregs in den Lungen, was sich durch weniger mRNA für Foxp-3 und weniger IL-10 Sekretion zeigt (Lee et al. 2007). Allerdings gibt es kontroverse Aussagen zu den Anteilen an Tregs in der BAL von COPD Patienten (Barcelo et al. 2008; Smyth et al. 2007). Die eigenen Daten lassen vermuten, dass Zigarettenrauch auf bereits vorhandene Tregs einen stabilisierenden und aktivitätsfördernden Effekt während der Expansion hat, wobei allerdings systemisch die Differenzierung von Tregs generell inhibiert wird. Die regulatorischen T Zellen wirken durch die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine, IL-10 und TGF- β immunmodulierend, da diese Zytokine Zell-Zyklus Arrest oder Apoptose in Effektorzellen induzieren können. Durch Rauch wird anscheinend die Aktivität einzelner Tregs mit erhöhter TGF- β Sekretion gefördert, aber gleichzeitig die Differenzierung der Tregs deutlich inhibiert. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zu Effektor T-Zellen (Th1, Th17 und Th9), die nicht mehr ausreichend in ihrer Funktionalität kontrolliert werden.

Th9 Zellen

Über die Rolle der Th9 Zellen in der Pathogenese von COPD ist noch sehr wenig bekannt. Kürzlich wurden jedoch in Sputumproben von COPD Patienten signifikant erhöhte Level an dem Th9 assoziierten Hauptzytokin IL-9 beschrieben (Liu et al. 2004). Eine andere Gruppe konnte erhöhte mRNA Level von IL-9 in Lungen-Biopsien von COPD Patienten zeigen (Panzner et al. 2003). Diese Daten lassen vermuten, dass IL-9 eine Rolle bei der COPD Pathogenese haben könnte.

Die erhöhten Werte von IL-9 müssen allerdings nicht zwingend nur mit den „klassischen“ Th9 Zellen in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CSE einen Wechsel von Th2 Zellen in eine Th9 ähnliche Subpopulation bewirkt, charakterisiert durch weniger Th2-Zytokine und gleichzeitigem Anstieg der IL-9 Produktion. Mit den vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass die IL-9 Sekretion IL-2 abhängig ist und in Th2 Zellen an Tag 3 der Polarisation ein Maximum aufwies, welches durch CSE zudem signifikant erhöht wurde. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten von Schmitt et al., die ebenfalls zeigten, dass IL-2 obligatorisch für die Differenzierung von

IL-9 produzierenden Zellen ist (Schmitt et al. 1994). Durch das Vorhandensein von TGF- β kann eine Th2 Zelle in eine Th9 Zelle konvertieren (Zhou et al. 2009). Allerdings konnte im CSE direkt kein TGF- β detektiert werden, so dass andere Komponenten im CSE für die erhöhte IL-9 Produktion in Th2 Zellen verantwortlich sein müssen. Die Restpopulationen, die nach der naïven T-Zell Aufreinigung noch vorhanden waren, können als TGF- β Produzent ausgeschlossen werden, da der Überstand dieser Populationen auf TGF- β Produktion untersucht wurde. Allerdings produzieren Th2 Zellen selbst TGF- β . Die relative Genexpression von GATA-3 und IL-13 nahm in den CSE behandelten Zellen ab, während die relative Genexpression von IL-9, PU.1 und BATF erhöht war. Dies spricht für einen tatsächlichen Phänotyp-Switch der Th2 Zellen. Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist auch mit dem Th2 Phänotyp assoziiert und bewirkt die Heterogenität der Th2 Zytokin-Sekretion. Dieser Transkriptionsfaktor ist speziell in Subpopulationen von Th2 Zellen mit niedriger IL-4 Expression exprimiert und führt zu einer niedrigeren Produktion der meisten Th2 Zytokine (Chang et al. 2009; Chang et al. 2005). IL-9 wurde lange Zeit als ein Th2 Zytokin beschrieben, da es die allergische Inflammation unterstützt und somit mit einer Th2 assoziierten Erkrankung (Asthma) in Verbindung gebracht wurde (Forbes et al. 2008; Temann et al. 1998; Temann et al. 2002). Obwohl eine allergische Inflammation auch in IL9 KO Mäusen entstehen kann, wirkt eine Blockade von IL-9 in einem ähnlichen Mausmodell hemmend auf die allergische Inflammation (Townsend et al. 2000; Cheng et al. 2002). Eine erhöhte Expression von IL-9 wurde nicht nur in COPD Patienten, sondern auch in Asthma-Patienten gefunden (Erpenbeck et al. 2003a; Erpenbeck et al. 2003b; Shimbara et al. 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass IL-9 die Differenzierung von Th17 Zellen unterstützt und gleichzeitig die Aktivität der Tregs erhöht und somit Th17 getriebene inflammatorische Erkrankungen induzieren kann (Elyaman et al. 2009; Nowak et al. 2009). Diese Aussagen können durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden, da gezeigt wurde, dass CSE die IL-17 Sekretion induziert und die Differenzierung von Tregs inhibiert, gleichzeitig aber die Aktivität dieser Zellen erhöht wird. Diese Veränderungen könnten IL-9-bedingt sein, da durch CSE erhöhte Level an IL-9 induziert werden. Kürzlich wurde eine neue Th Subpopulation, Th9-Zellen beschrieben, die für die spezifische Polarisation eine Kombination aus TGF- β ,

IL-4 und IL-2 benötigt. Diese Zellen exprimieren zusätzlich zum Transkriptionsfaktor GATA-3 die Transkriptionsfaktoren PU.1 und BATF. Außerdem zeigen sie eine geringere Expression der Th2 assoziierten Zytokine (Veldhoen et al. 2008; Nowak und Noelle 2009; Chang et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch nicht nur einen Wechsel der Th2 Zellen zu einem Th9 Phänotypen bewirkt, sondern der Th9 Phänotyp durch Zigarettenrauch weiter unterstützt wird. Somit unterstützen diese Daten die Hypothese, dass Th9 Zellen in der Pathogenese der COPD eine bedeutende Rolle spielen könnten. Naïve Zellen, die in Richtung Th9 Zelle polarisiert wurden, zeigen durch die Einwirkung von CSE eine signifikant gesteigerte Expression von IL-9. Dieses Ergebnis konnte mittels verschiedener Methoden deutlich dargestellt werden, indem die Anzahl an IL-9+ Zellen, die relative MFI sowie die relative Genexpression von IL-9, PU.1 und BATF durch CSE signifikant erhöht war und die Th2 assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13 vermindert sezerniert wurden. Da CSE die Proliferation der Th9 Zellen ebenso verzögert, wie die aller anderen Th Subpopulationen, stellte sich die Frage, welche Population der Th9 Zellen (Proliferations gehemmte Th-9 Zellen oder schon proliferierte Th9-Zellen) die CSE induzierte verstärkte IL-9 Produktion aufwies. Es konnte gezeigt werden, dass nur die schon proliferierten Zellen eine IL-9+ Population bildeten. Auch für die Th9 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation durch CSE nur temporär gehemmt wurde, da sich nach 6 Tagen Polarisation keine veränderte Proliferationsrate mehr detektiert wurde. *In vivo* konnten in den lungenperipheren Lymphknoten und in der Lunge signifikant mehr IL-9+ CD4+ Zellen nachgewiesen werden. Da in der Milz kein Unterschied aufgezeigt wurde, erscheinen 5 Monate Rauchexposition als noch nicht ausreichend, um eine systemisch erhöhte IL-9 Expression zu induzieren oder die beobachtete rauchinduzierte vermehrte IL-9 Produktion äußert sich nur lokal in der Lunge. Das lässt vermuten dass in COPD Patienten durch anhaltende Rauchexposition Th2 Zellen zu einem Th9 Phänotypen gewandelt werden und dass durch Zigarettenrauch nicht nur die IL-9 Produktion der Th2 sondern auch die der Th9 Zellen signifikant gesteigert wird.

IL-9 wirkt direkt und indirekt auf viele Zelltypen, die an der Entwicklung einer Inflammation beteiligt sind. In den Epithelzellen induziert IL-9 Goblet Zell-Hyperplasie und eine gesteigerte Chemokinproduktion. Durch IL-9 wird das

Zellwachstum und Überleben von Mastzellen gefördert und es induziert in diesen Zellen die Produktion von IL-6 und Proteasen (MMPs). In der glatten Muskulatur wird durch IL-9 die Produktion von IL-8, IL-13 und Eotaxin induziert. IL-9 unterstützt außerdem die Differenzierung von Th17 Zellen, erhöht die Aktivität der Tregs und fördert die IgE Produktion in B Zellen sowie die Expression des Wachstumsfaktors TGF β in T Zellen (Goswami und Kaplan 2011). Diese durch IL-9 hervorgerufenen Veränderungen könnten zum Pathomechanismus der COPD beitragen. Daher wäre in Zukunft die Untersuchung des Zigarettenrauch-induzierten Lungen-Inflammations-Phänotyps an IL-9 KO Mäusen ein vielversprechender Ansatz um die der COPD zugrunde liegenden Pathomechanismen näher aufzuschlüsseln.

Mit den *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass Zigarettenrauch-Komponenten einen direkten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von CD4+ Zellen haben. Es kommt zu einer Verzögerung der Proliferation, verbunden mit Änderungen in der Zytokinproduktion und einer Beeinflussung der Differenzierungsrate. Diese Veränderungen führen zur vermehrten Freisetzung von IFN γ + Th1, IL-9+ Th9 und IL-17+ Th17 Zellen wobei gleichzeitig die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen inhibiert wird und die Anzahl der schon vorhanden Tregs stabilisiert wird.

Im Anschluss erfolgt nun die Betrachtung des Lymphozyten Phänotyps im chronischen Rauchmodell und die Diskussion über lymphoide B-Zell Follikel und autoimmune Prozesse, welche in der Pathogenese der COPD vermutlich eine Rolle spielen.

Lymphozyten Phänotyp im chronischen Rauchmodell

Da die Entzündungsreaktionen in der Lunge schon relativ frühzeitig in der Pathogenese der COPD auftreten und die Emphysem-Bildung erst nach einer längeren Rauchexpositionszeit entsteht wurde ein früher Analysezeitpunkt (2 Monate) und ein späterer Analysezeitpunkt (5 Monate) für das *in vivo* Rauchmodell gewählt.

Obwohl nach einer Rauchexpositionszeit von 2 und 5 Monaten kein Einfluss auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten in der BAL nachzuweisen war, konnte in der Lungenfunktion schon der erwartete Trend für eine Emphysem-Bildung nach 5 Monaten Rauchexposition detektiert werden. Auch histologisch konnte nach der längeren Rauchexpositionszeit von 5 Monaten schon eine deutliche Emphysem-Bildung nachgewiesen werden. Dieser Rauch-induzierte Lungen-Phänotyp validiert das verwendete Rauchmodell, so dass weiterführende, tiefergreifende Analysen durchgeführt wurden.

Nach 2 Monaten Rauchexposition erhöhte sich die Anzahl der Lymphozyten und nach 5 Monaten Rauchexposition zeigte sich ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten Zellzahl in der BAL. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in dem Lungenhomogenat der chronisch berauchten Tiere schon nach 2 Monaten signifikant mehr CD3+ Zellen zu finden waren, die sich sowohl als mehr CD4+ Zellen als auch mehr CD8+ Zellen darstellten. In den peripheren Lungenlymphknoten konnte erst nach einer längeren Rauchexpositionszeit von 5 Monaten ein signifikanter Anstieg der CD3+CD4+ und CD3+CD8+ Zellen gesehen werden. An der chronischen Entzündung in COPD Patienten sind vor allem Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten beteiligt (Barnes 2003).

Die vorliegenden Daten der gesteigerten Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL korrelieren mit humanen Daten einer Studie mit COPD Patienten (Stockley 2002). In COPD Patienten werden vermehrt aktivierte CD4+ und CD8+ Zellen im Lungenparenchym, den peripheren und zentralen Atemwegen detektiert (Saetta et al. 1999; Mikko et al. 2013; Roos-Engstrand et al. 2009). Die vorliegenden Daten aus dem *in vivo* Mausmodell bestätigen diese Ergebnisse. Der Einfluss von Zigarettenrauch *in vivo* auf die Zusammensetzung der einzelnen Th Subtypen der gesteigerten CD4+ Population wurde innerhalb der einzelnen Untergruppen diskutiert.

Lymphoide B-Zell Follikel und autoimmune Prozesse

Im chronischen *in vivo* Rauchmodell konnten keine lymphoiden B-Zell Follikel in den Lungen der Mäuse detektiert werden. Allerdings werden in COPD-Patienten peribronchial der kleinen Atemwege und peripher im Lungenparenchym vermehrt diese lymphoiden Follikel mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung gesehen (van der Strate et al. 2006; Hogg 2004). Außerdem zeigten die vorliegenden Ergebnisse der Histologie zwar eine Emphysem-Bildung, aber keine vermehrte Inflammation in den Lungen der chronisch berauchten Tiere. Dies spricht dafür, dass entweder Zigarettenrauch alleine nicht ausreichend ist oder es einer längeren Expositionszeit bedarf, um die inflammatorischen bzw. autoimmunen Prozesse der COPD Pathogenese hervorzurufen. Hierfür wäre es sinnvoll, die autoimmun-getriebene Schiene, die die chronische Entzündung selbst nach Beendigung der Rauchexposition aufrechterhält, mit in Betracht zu ziehen. Für das Mitwirken von autoimmunreaktiven Prozessen im Pathomechanismus der COPD spricht nicht nur die Präsenz von B-Zell geprägten lymphoiden Follikeln sondern auch die Detektion von diversen Autoantikörpern, im Besonderen anti-Elastin Antikörper, im Serum von Untergruppen der COPD-Patienten (Nunez et al. 2011; Lee et al. 2007; Greene et al. 2010). Die pathophysiologische Relevanz von autoimmunreaktiven Prozessen bei COPD ist letztlich noch nicht geklärt. Dafür müsste ein neuartiges Mausmodell, in dem ein Phänotyp mit Emphysembildung, chronischer Entzündung und anti-Elastin Antikörpern induziert werden kann, etabliert werden. Dies könnte zukünftig durch eine Kombination von einer Elastin-Immunisierung mit einer chronischen Rauchexposition realisiert werden. Das verwendete chronische Mausmodell konnte aussagekräftige Daten zum Effekt von Zigarettenrauch auf die einzelnen Th Subpopulationen liefern, aber um die Komplexität des der COPD zugrundeliegenden Pathomechanismus besser zu verstehen, bedarf es neuer Ansätze. Daher ist in diesem Feld noch ein großer Bedarf an der Entwicklung und Erforschung geeigneter COPD-Mausmodelle.

Abschließend lässt sich festhalten, dass Zigarettenrauch-Komponenten einen direkten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von CD4+ Zellen haben. Es kommt zu einer Verzögerung der Proliferation, verbunden mit

Änderungen in der Zytokinproduktion und einer Beeinflussung der Differenzierungsrate. Diese Veränderungen führen zur vermehrten Freisetzung von $\text{IFN}\gamma^+$ Th1, IL-9⁺ Th9 und IL-17⁺ Th17 Zellen wobei gleichzeitig die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen inhibiert wird und die Anzahl der schon vorhanden Tregs stabilisiert wird. Somit führt Zigarettenrauch zu Änderungen des Zytokin-Milieus, welches eine chronische Inflammation und autoimmune Prozesse unterstützt und so einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese in der COPD hat.

5 Literaturverzeichnis

Agarwal S, Misra R, Aggarwal A (2008) Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases *J Rheumatol*. 2008 Mar; 35(3):515-9.

Amsen, Derk; Spilianakis, Charalampos G.; Flavell, Richard A. (2009): How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? In: *Curr Opin Immunol* 21 (2), S. 153–160.

Balmes, John; Becklake, Margaret; Blanc, Paul; Henneberger, Paul; Kreiss, Kathleen; Mapp, Cristina et al. (2003): American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 167 (5), S. 787–797.

Barcelo, B.; Pons, J.; Ferrer, J. M.; Sauleda, J.; Fuster, A.; Agusti, A. G. N. (2008): Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. In: *Eur Respir J* 31 (3), S. 555–562.

Barczyk, Adam; Pierzchala, Wladyslaw; Kon, Onn M.; Cosio, Borja; Adcock, Ian M.; Barnes, Peter J. (2006): Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. In: *J Allergy Clin Immunol* 117 (6), S. 1484–1492.

Barker, D. J.; Godfrey, K. M.; Fall, C.; Osmond, C.; Winter, P. D.; Shaheen, S. O. (1991): Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. In: *BMJ* 303 (6804), S. 671–675.

Barnes, P. J. (2000): Chronic obstructive pulmonary disease. In: *N Engl J Med* 343 (4), S. 269–280.

Barnes, P. J. (2001): New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Curr Opin Pharmacol* 1 (3), S. 217–222.

Barnes, P. J.; Shapiro, S. D.; Pauwels, R. A. (2003): Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. In: *Eur Respir J* 22 (4), S. 672–688.

Barnes, Peter J. (2003): New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Ann Ist Super Sanita* 39 (4), S. 573–582.

Barnes, Peter J. (2004): Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. In: *COPD* 1 (1), S. 59–70.

Barnes, Peter J. (2007): Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic. In: *PLoS Med* 4 (5), S. e112.

Barnes, Peter J. (2008): The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *J. Clin. Invest.* 118 (11), S. 3546–3556.

Barnes, Peter J. (2009): The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 41 (6), S. 631–638.

Barnes, Peter J. (2010): Inhaled corticosteroids in COPD: a controversy. In: *Respiration* 80 (2), S. 89–95.

Barnes, Peter J. (2013): New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Nat Rev Drug Discov* 12 (7), S. 543–559.

Behrendt, Carolyn E. (2005): Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. In: *Chest* 128 (3), S. 1239–1244.

Betts JC, Mayer RJ, Tal-Singer R, Warnock L, Clayton C, Bates S, Hoffman BE, Larminie C, Singh D. (2015): Gene expression changes caused by the p38 MAPK inhibitor diltiazem in COPD patients: analysis of blood and sputum samples from a randomized, placebo-controlled clinical trial. In: *Pharmacol Res Perspect* 3(1):e00094.

Bhavani S, Tsai CL, Perusich S, Hesselbacher S, Coxson H, Pandit L, Corry DB, Kheradmand F (2015). Clinical and Immunological Factors in Emphysema Progression. Five-Year Prospective Longitudinal Exacerbation Study of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (LES-COPD) *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Nov 15;192(10):1171-8. doi: 10.1164/rccm.201504-0736OC.

Boutten, A.; Bonay, M.; Laribe, S.; Leseche, G.; Castier, Y.; Lecon-Malas, V. et al. (2004): Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema. In: *Thorax* 59 (10), S. 850–854.

Calverley, Peter M. A.; Rabe, Klaus F.; Goehring, Udo-Michael; Kristiansen, Soren; Fabbri, Leonardo M.; Martinez, Fernando J. (2009): Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. In: *Lancet* 374 (9691), S. 685–694.

Castaldi, Peter J.; Cho

Cazzola M, Lopez-Campos JL, Puente-Maestu L. (2013): The MABA approach: a new option to improve bronchodilator therapy. In: *Eur Respir J*;42(4):885-7.

Celli, Bartolome R.; Halbert, R. J.; Nordyke, Michael H.; Cohn, Matthew; Langerman, Fawn; Moran, Sienna; Tarragona, Nestor et al. (2010): The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. In: *Hum Mol Genet* 19 (3), S. 526–534.

Celli, Robert J.; Schau, Brigitte (2005): Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. In: *Am J Med* 118 (12), S. 1364–1372.

Chang, Hua-Chen; Han, Ling; Jabeen, Rukhsana; Carotta, Sebastian; Nutt, Stephen L.; Kaplan, Mark H. (2009): PU.1 regulates TCR expression by modulating GATA-3 activity. In: *J Immunol* 183 (8), S. 4887–4894.

Chang, Hua-Chen; Sehra, Sarita; Goswami, Ritobrata; Yao, Weiguo; Yu, Qing; Stritesky, Gretta L. et al. (2010): The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. In: *Nat Immunol* 11 (6), S. 527–534.

Chang, Hua-Chen; Zhang, Shangming; Thieu, Vivian T.; Slee, Roger B.; Bruns, Heather A.; Laribee, R. Nicholas et al. (2005): PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. In: *Immunity* 22 (6), S. 693–703.

Cheng, Gang; Arima, Masafumi; Honda, Kyoko; Hirata, Hirokuni; Eda, Fukiko; Yoshida, Nozomi et al. (2002): Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. In: *Am J Respir Crit Care Med* 166 (3), S. 409–416.

Chen K, Pociask DA, McAleer JP, Chan YR, Alcorn JF, Kreindler JL, Keyser MR, Shapiro SD, Houghton AM, Kolls JK, Zheng M (2011) IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. *PLoS One*. 2011; 6(5):e20333.

Chen, Ling; Ge, Qi; Tjin, Gavin; Alkhouri, Hatem; Deng, Linghong; Brandsma, Corry-Anke et al. (2014): Effects of cigarette smoke extract on human airway smooth muscle cells in COPD. In: *Eur Respir J* 44 (3), S. 634–646.

Chung, K. F.; Adcock, I. M. (2008): Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. In: *Eur Respir J* 31 (6), S. 1334–1356.

Dasgupta, Alakananda; Saxena, Renu (2012): Regulatory T cells: a review. In: *Natl Med J India* 25 (6), S. 341–351.

Dai M-Y, Qiao J-P, Xu Y-H, Fei G-H. Respiratory infectious phenotypes in acute exacerbation of COPD: an aid to length of stay and COPD Assessment Test.(2015) International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2015;10:2257-2263. doi:10.2147/COPD.S92160.

Di Stefano, A.; Caramori, G.; Gnemmi, I.; Contoli, M.; Vicari, C.; Capelli, A. et al. (2009): T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. In: *Clin Exp Immunol* 157 (2), S. 316–324.

Di Stefano, A.; Caramori, G.; Capelli, A.; Gnemmi, I.; Ricciardolo, F. L.; Oates, T. et al. (2004): STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Eur Respir J* 24 (1), S. 78–85.

Donnelly, Louise E.; Barnes, Peter J. (2012): Defective phagocytosis in airways disease. In: *Chest* 141 (4), S. 1055–1062.

Eiserich, J. P.; van der Vliet, A.; Handelman, G. J.; Halliwell, B.; Cross, C. E. (1995): Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. In: *Am J Clin Nutr* 62 (6 Suppl), S. 1490S-1500S.

Eisner, Mark D.; Anthonisen, Nicholas; Coultas, David; Kuenzli, Nino; Perez-Padilla, Rogelio; Postma, Dirkje et al. (2010): An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 182 (5), S. 693–718.

Eisner, Mark D.; Balmes, John; Katz, Patricia P.; Trupin, Laura; Yelin, Edward H.; Blanc, Paul D. (2005): Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Environ Health* 4 (1), S. 7.

Ekberg-Jansson, A.; Andersson, B.; Avra, E.; Nilsson, O.; Lofdahl, C. G. (2000): The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. In: *Respir Med* 94 (3), S. 264–272.

Elyaman, W.; Bradshaw, E. M.; Uyttenhove, C.; Dardalhon, V.; Awasthi, A.; Imitola, J. et al. (2009): IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31), S. 12885–12890.

Erpenbeck, Veit J.; Hohlfeld, Jens M.; Discher, Marc; Krentel, Harald; Hagenberg, Andreas; Braun, Armin; Krug, Norbert (2003a): Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics. In: *Chest* 123 (3 Suppl), S. 370S.

Erpenbeck, Veit J.; Hohlfeld, Jens M.; Volkmann, Brunhild; Hagenberg, Andreas; Geldmacher, Henning; Braun, Armin; Krug, Norbert (2003b): Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. In: *J Allergy Clin Immunol* 111 (6), S. 1319–1327.

Ezzati, M.; Kammen, D. M. (2001): Quantifying the effects of exposure to indoor air pollution from biomass combustion on acute respiratory infections in developing countries. In: *Environ Health Perspect* 109 (5), S. 481–488.

Fabbri, L. M.; Hurd, S. S. (2003): Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. In: *Eur Respir J* 22 (1), S. 1–2.

Fahy, J. V.; Schuster, A.; Ueki, I.; Boushey, H. A.; Nadel, J. A. (1992): Mucus hypersecretion in bronchiectasis. The role of neutrophil proteases. In: *Am Rev Respir Dis* 146 (6), S. 1430–1433.

Feuerer, Markus; Hill, Jonathan A.; Mathis, Diane; Benoist, Christophe (2009): Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. In: *Nat Immunol* 10 (7), S. 689–695.

Forbes, Elizabeth E.; Groschwitz, Katherine; Abonia, J. Pablo; Brandt, Eric B.; Cohen, Elizabeth; Blanchard, Carine et al. (2008): IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. In: *J Exp Med* 205 (4), S. 897–913.

Foreman, Marilyn G.; Zhang, Lening; Murphy, James; Hansel, Nadia N.; Make, Barry; Hokanson, John E. et al. (2011): Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. In: *Am J Respir Crit Care Med* 184 (4), S. 414–420.

Freeman, C. M.; Han, M. K.; Martinez, F. J.; Murray, S.; Liu, L. X.; Chensue, S. W. et al. (2010): Cytotoxic Potential of Lung CD8⁺ T Cells Increases with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity and with In Vitro Stimulation by IL-18 or IL-15. In: *The Journal of Immunology* 184 (11), S. 6504–6513.

Freeman, Christine M.; Martinez, Fernando J.; Han, MeiLan K.; Ames, Theresa M.; Chensue, Stephen W.; Todt, Jill C. et al. (2009): Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 180 (12), S. 1179–1188.

Gershon, Andrea S.; Dolmage, Thomas E.; Stephenson, Anne; Jackson, Beth (2012): Chronic obstructive pulmonary disease and socioeconomic status: a systematic review. In: *COPD* 9 (3), S. 216–226.

Gershon, Andrea S.; Hwee, Jeremiah; Victor, J. Charles; Wilton, Andrew S.; To, Teresa (2014): Trends in socioeconomic status related differences in mortality among people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In: *Ann Am Thorac Soc*.

Gershon, Andrea S.; Warner, Laura; Cascagnette, Paul; Victor, J. Charles; To, Teresa (2011): Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. In: *Lancet* 378 (9795), S. 991–996.

Glader, Pernilla; Moller, Sebastian; Lilja, Johanna; Wieslander, Elisabet; Lofdahl, Claes-Goran; Wachenfeldt, Karin von (2006): Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells. In: *Respir Med* 100 (5), S. 818–827.

Goswami, Ritobrata; Kaplan, Mark H. (2011): A brief history of IL-9. In: *J Immunol* 186 (6), S. 3283–3288.

Gottlieb, D. J.; Stone, P. J.; Sparrow, D.; Gale, M. E.; Weiss, S. T.; Snider, G. L.; O'Connor, G. T. (1996): Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. In: *Am J Respir Crit Care Med* 154 (5), S. 1290–1295.

Grashoff, W. F.; Sont, J. K.; Sterk, P. J.; Hiemstra, P. S.; Boer, W. I. de; Stolk, J. et al. (1997): Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. In: *Am J Pathol* 151 (6), S. 1785–1790.

Greene, Catherine M.; Low, Teck Boon; O'Neill, Shane J.; McElvaney, Noel G. (2010): Anti-Proline-Glycine-Proline or Antielastin Autoantibodies Are Not Evident in Chronic Inflammatory Lung Disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 181 (1), S. 31–35.

Grumelli, Sandra; Corry, David B.; Song, Li-Zhen; Song, Ling; Green, Linda; Huh, Joseph et al. (2004): An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. In: *PLoS Med* 1 (1), S. e8.

Guerassimov, Alexei; Hoshino, Yuma; Takubo, Yasutaka; Turcotte, Antony; Yamamoto, Midori; Ghezzi, Heberto et al. (2004): The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. In: *Am J Respir Crit Care Med* 170 (9), S. 974–980.

Hackett, Tillie-Louise; Holloway, Rebecca; Holgate, Stephen T.; Warner, Jane A. (2008): Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. In: *Respir Res* 9, S. 47.

Hernandez, Claudia P.; Morrow, Kevin; Velasco, Cruz; Wyczachowska, Dorota D.; Naura, Amarjit S.; Rodriguez, Paulo C. (2013): Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells. In: *Cell Immunol* 282 (1), S. 38–43.

Hnizdo, Eva; Sullivan, Patricia A.; Bang, Ki Moon; Wagner, Gregory (2004): Airflow obstruction attributable to work in industry and occupation among U.S. race/ethnic groups: a study of NHANES III data. In: *Am J Ind Med* 46 (2), S. 126–135.

Hodge, Sandra; Hodge, Greg; Scicchitano, Raffaele; Reynolds, Paul N.; Holmes, Mark (2003): Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. In: *Immunol Cell Biol* 81 (4), S. 289–296.

Hogg, James C. (2004): Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Lancet* 364 (9435), S. 709–721.

Hogg, James C.; Chu, Fanny; Utokaparch, Soraya; Woods, Ryan; Elliott, W. Mark; Buzatu, Liliana et al. (2004): The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. In: *N Engl J Med* 350 (26), S. 2645–2653.

Holloway, Rebecca A.; Donnelly, Louise E. (2013): Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Curr Opin Pulm Med* 19 (2), S. 95–102.

Holt, P. G. (1987): Immune and inflammatory function in cigarette smokers. In: *Thorax* 42 (4), S. 241–249.

Hughes AD, Chen Y, Hegde SS, Jasper JR, Jaw-Tsai S, Lee TW, McNamara A, Pulido-Rios MT, Steinfeld T, Mammen M. (2015): Discovery of (R)-1-(3-((2-Chloro-4-(((2-hydroxy-2-(8-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-5-yl)ethyl)amino)methyl)-5 methoxyphenyl)amino)-3-oxopropyl)piperidin-4-yl [1,1'-Biphenyl]-2-ylcarbamate (TD-5959, GSK961081, Batefenterol): First-in-Class Dual Pharmacology Multivalent Muscarinic Antagonist and β 2 Agonist (MABA) for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In: *J Med Chem* 58(6):2609-22.

Hunninghake, Gary M.; Cho, Michael H.; Tesfaigzi, Yohannes; Soto-Quiros, Manuel E.; Avila, Lydiana; Lasky-Su, Jessica et al. (2009): MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. In: *N Engl J Med* 361 (27), S. 2599–2608.

Jabeen, Rukhsana; Goswami, Ritobrata; Awe, Olufolakemi; Kulkarni, Aishwarya; Nguyen, Evelyn T.; Attenasio, Andrea et al. (2013): Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. In: *J Clin Invest* 123 (11), S. 4641–4653.

Kemeny, D. M.; Vyas, B.; Vukmanovic-Stejic, M.; Thomas, M. J.; Noble, A.; Loh, L. C.; O'Connor, B. J. (1999): CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 160 (5 Pt 2), S. S33-7.

Kew, Kayleigh M.; Dias, Sofia; Cates, Christopher J. (2014): Long-acting inhaled therapy (beta-agonists, anticholinergics and steroids) for COPD: a network meta-analysis. In: *Cochrane Database Syst Rev* 3, S. CD010844.

Knobloch J1, Chikosi SJ2, Yanik S3, Rupp J4, Jungck D2, Koch A2.

A systemic defect in toll-like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide-induced suppression of IL-2-dependent T-cell proliferation in COPD (2015). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Oct 23;ajplung.00367.2014. doi: 10.1152/ajplung.00367.2014. [Epub ahead of print]

Kohansal, Robab; Martinez-Camblor, Pablo; Agusti, Alvar; Buist, A. Sonia; Mannino, David M.; Soriano, Joan B. (2009): The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. In: *Am J Respir Crit Care Med* 180 (1), S. 3–10.

Lambrecht, Bart N.; Hammad, Hamida (2010): The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. In: *Lancet* 376 (9743), S. 835–843.

Lams, B. E.; Sousa, A. R.; Rees, P. J.; Lee, T. H. (1998): Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 158 (5 Pt 1), S. 1518–1523.

Lee, Seung-Hyo; Goswami, Sangeeta; Grudo, Ariel; Song, Li-Zhen; Bandi, Venkata; Goodnight-White, Sheila et al. (2007): Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. In: *Nat Med* 13 (5), S. 567–569.

Lieberman, J.; Winter, B.; Sastre, A. (1986): Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. In: *Chest* 89 (3), S. 370–373.

Lin, Chunyan; Chen, Li; Huang, Zhihong; Wu, Yi; Liu, Shengming (2014a): Effect of cigarette smoke extraction on the expression of found in inflammatory zone 1 in rat lung epithelial L2 cells. In: *Chin Med J (Engl)* 127 (12), S. 2363–2367.

Lin, Xi-Xi; Yang, Xin-Fu; Jiang, Jun-Xia; Zhang, Shui-Juan; Guan, Yan; Liu, Ya-Nan et al. (2014b): Cigarette smoke extract-induced BEAS-2B cell apoptosis and anti-oxidative Nrf-2 up-regulation are mediated by ROS-stimulated p38 activation. In: *Toxicol Mech Methods*, S. 1–9.

Liu, Zheng; Yao, Wan-zhen; Chen, Yan; Ding, Yan-ling (2004): Role of interleukin-9 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Beijing Da Xue Xue Bao* 36 (4), S. 403–406.

Lommatzsch, M.; Bratke, K.; Knappe, T.; Bier, A.; Dreschler, K.; Kuepper, M. et al. (2010): Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo. In: *Eur Respir J* 35 (5), S. 1130–1136.

Lucey, E. C.; Goldstein, R. H.; Stone, P. J.; Snider, G. L. (1998): Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. In: *Am J Respir Crit Care Med* 158 (2), S. 555–564.

Luo, Hongbo R.; Loison, Fabien (2008): Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. In: *Am J Hematol* 83 (4), S. 288–295.

MacNee, W.; Rahman, I. (2001): Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? In: *Trends Mol Med* 7 (2), S. 55–62.

Magombedze, Gesham; Reddy, Pradeep B. J.; Eda, Shigetoshi; Ganusov, Vitaly V. (2013): Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. In: *Front Physiol* 4, S. 206.

Manel, Nicolas; Unutmaz, Derya; Littman, Dan R. (2008): The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. In: *Nat Immunol* 9 (6), S. 641–649.

Marcy, T. W.; Merrill, W. W. (1987): Cigarette smoking and respiratory tract infection. In: *Clin Chest Med* 8 (3), S. 381–391.

Matera, Maria Gabriella; Page, Clive P.; Cazzola, Mario (2011): Novel bronchodilators for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Trends Pharmacol Sci* 32 (8), S. 495–506.

Mathers, Colin D.; Loncar, Dejan (2006): Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. In: *PLoS Med* 3 (11), S. e442.

Matheson, M. C.; Benke, G.; Raven, J.; Sim, M. R.; Kromhout, H.; Vermeulen, R. et al. (2005): Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Thorax* 60 (8), S. 645–651.

Martey CA, Bagloli CJ, Gasiewicz TA, Sime PJ, Phipps RP (2008) The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Sep; 289(3):L391-9.

McCloskey, S. C.; Patel, B. D.; Hinchliffe, S. J.; Reid, E. D.; Wareham, N. J.; Lomas, D. A. (2001): Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. In: *Am J Respir Crit Care Med* 164 (8 Pt 1), S. 1419–1424.

Metcalf, H. J.; Lea, S.; Hughes, D.; Khalaf, R.; Abbott-Banner, K.; Singh, D. (2014): Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. In: *Clin Exp Immunol* 176 (3), S. 461–472.

Mikko, M.; Forsslund, H.; Cui, L.; Grunewald, J.; Wheelock, Å.M; Wahlström, J.; Sköld, C.M (2013): Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. In: *Immunobiology* 218 (2), S. 225–231.

Miossec, Pierre; Korn, Thomas; Kuchroo, Vijay K. (2009): Interleukin-17 and type 17 helper T cells. In: *N Engl J Med* 361 (9), S. 888–898.

Mortaz, E.; Adcock, I. M.; Ito, K.; Kraneveld, A. D.; Nijkamp, F. P.; Folkerts, G. (2010): Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. In: *Eur Respir J* 36 (5), S. 1143–1154.

Nadel, J. A.; Burgel, P. R. (2001): The role of epidermal growth factor in mucus production. In: *Curr Opin Pharmacol* 1 (3), S. 254–258.

Nowak, Elizabeth C.; Noelle, Randolph J. (2009): Interleukin-9 and T cell subsets. In: *Cell Cycle* 8 (23), S. 3798–3799.

Nowak, Elizabeth C.; Weaver, Casey T.; Turner, Henrietta; Begum-Haque, Sakhina; Becher, Burkhard; Schreiner, Bettina et al. (2009): IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. In: *J Exp Med* 206 (8), S. 1653–1660.

Nunez, Belen; Sauleda, Jaume; Anto, Josep Maria; Julia, Maria Rosa; Orozco, Mauricio; Monso, Eduard et al. (2011): Anti-tissue antibodies are related to lung function in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 183 (8), S. 1025–1031.

O'Garra, A.; Arai, N. (2000): The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. In: *Trends Cell Biol* 10 (12), S. 542–550.

Orozco-Levi, M.; Garcia-Aymerich, J.; Villar, J.; Ramirez-Sarmiento, A.; Anto, J. M.; Gea, J. (2006): Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Eur Respir J* 27 (3), S. 542–546.

O'Shaughnessy, T. C.; Ansari, T. W.; Barnes, N. C.; Jeffery, P. K. (1997): Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. In: *Am J Respir Crit Care Med* 155 (3), S. 852–857.

Owen, Caroline A. (2008): Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3 (2), S. 253–268.

Palmer, Matthew T.; Weaver, Casey T. (2010): Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup. In: *Nat Immunol* 11 (1), S. 36–40.

Panzner, Petr; Lafitte, Jean-Jacques; Tsicopoulos, Anne; Hamid, Qutayba; Tulic, Meri K. (2003): Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients With chronic bronchitis with obstruction. In: *Chest* 124 (5), S. 1909–1915.

Paone, Gregorino; Conti, Vittoria; Vestri, Annarita; Leone, Alvaro; Puglisi, Giovanni; Benassi, Fulvio et al. (2011): Analysis of sputum markers in the evaluation of lung inflammation and functional impairment in symptomatic smokers and COPD patients. In: *Dis Markers* 31 (2), S. 91–100.

Papaioannou, Andriana I.; Bania, Eleni; Alexopoulos, Evangelos C.; Mitsiki, Eirini; Malli, Foteini; Gourgoulisanis, Konstantinos I. (2014): Sex discrepancies in COPD patients and burden of the disease in females: a nationwide study in Greece (Greek Obstructive Lung Disease Epidemiology and health ecoNomics: GOLDEN study). In: *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 9, S. 203–213.

Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Batzios S, et al. Acute exacerbations of COPD are associated with significant activation of matrix metalloproteinase 9 irrespectively of airway obstruction, emphysema and infection (2015). *Respiratory Research*. 2015;16(1):78. doi:10.1186/s12931-015-0240-4.

Pauwels, Romain A.; Rabe, Klaus F. (2004): Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In: *Lancet* 364 (9434), S. 613–620.

Pfeifer, Gerd P.; Denissenko, Mikhail F.; Olivier, Magali; Tretyakova, Natalia; Hecht, Stephen S.; Hainaut, Pierre (2002): Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. In: *Oncogene* 21 (48), S. 7435–7451.

Prescott, E.; Vestbo, J. (1999): Socioeconomic status and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Thorax* 54 (8), S. 737–741.

Raad, Dany; Gaddam, Swarna; Schunemann, Holger J.; Irani, Jihad; Abou Jaoude, Philippe; Honeine, Roland; Akl, Elie A. (2011): Effects of water-pipe smoking on lung function: a systematic review and meta-analysis. In: *Chest* 139 (4), S. 764–774.

Razani-Boroujerdi, Seddigheh; Singh, Shashi P.; Knall, Cindy; Hahn, Fletcher F.; Pena-Philippides, Juan Carlos; Kalra, Roma et al. (2004): Chronic nicotine inhibits inflammation and promotes influenza infection. In: *Cell Immunol* 230 (1), S. 1–9.

Rennard SI¹, Dale DC, Donohue JF, Kanniss F, Magnussen H, Sutherland ER, Watz H, Lu S, Stryszak P, Rosenberg E, Staudinger H. (2015): CXCR2 Antagonist MK-7123-A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *Am J Respir Crit Care Med.* (in print)

Rinaldi, Manuela; Lehouck, An; Heulens, Nele; Lavend'homme, Renaud; Carlier, Vincent; Saint-Remy, Jean-Marie et al. (2012): Antielastin B-cell and T-cell immunity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Thorax* 67 (8), S. 694–700.

Robbe P1, Spierenburg EA2, Draijer C3, Brandsma CA1, Telenga E4, van Oosterhout AJ5, van den Berge M4, Luinge M1, Melgert BN3, Heederik D2, Timens W1, Wouters IM2, Hylkema MN1. Shifted T-cell polarisation after agricultural dust exposure in mice and men (2014). *Thorax*. 2014 Jul;69(7):630-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204295. Epub 2014 Feb 17.

Roos AB, Sanjay Sethi, Jake Nikota, Catherine T. Wrona, Michael G. Dorrington, Caroline Sandén, Carla M. T. Bauer, Pamela Shen, Dawn Bowdish, Christopher S. Stevenson, Jonas S. Erjefält, and Martin R. Stampfli "IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease"(2015), *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 192, No. 4 (2015), pp. 428-437.

Roos-Engstrand, Ester; Ekstrand-Hammarström, Barbro; Pourazar, Jamshid; Behndig, Annelie F.; Bucht, Anders; Blomberg, Anders (2009): Influence of Smoking Cessation on Airway T Lymphocyte Subsets in COPD. In: *COPD* 6 (2), S. 112–120.

Russell, Richard E. K.; Culpitt, Sarah V.; DeMatos, Carmen; Donnelly, Louise; Smith, Michael; Wiggins, John; Barnes, Peter J. (2002): Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 26 (5), S. 602–609.

Saetta, M.; Baraldo, S.; Corbino, L.; Turato, G.; Braccioni, F.; Rea, F. et al. (1999): CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 160 (2), S. 711–717.

Saetta, M.; Di Stefano, A.; Turato, G.; Facchini, F. M.; Corbino, L.; Mapp, C. E. et al. (1998): CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 157 (3 Pt 1), S. 822–826.

Salvi, Sundeep (2014): Tobacco smoking and environmental risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Clin Chest Med* 35 (1), S. 17–27.

Sriskanharajah S, Hamblin N, Worsley S, Calver AR, Hessel EM, Amour A. (2013): Targeting phosphoinositide 3-kinase δ for the treatment of respiratory diseases. In: *Ann N Y Acad Sci*.1280:35-9.

Schmitt, E.; Germann, T.; Goedert, S.; Hoehn, P.; Huels, C.; Koelsch, S. et al. (1994): IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. In: *J Immunol* 153 (9), S. 3989–3996.

Seder, Robert A.; Ahmed, Rafi (2003): Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. In: *Nat Immunol* 4 (9), S. 835–842.

Seemungal, T.; Harper-Owen, R.; Bhowmik, A.; Moric, I.; Sanderson, G.; Message, S. et al. (2001): Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 164 (9), S. 1618–1623.

Seimetz, Michael; Parajuli, Nirmal; Pichl, Alexandra; Veit, Florian; Kwapiszewska, Grazyna; Weisel, Friederike C. et al. (2011): Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. In: *Cell* 147 (2), S. 293–305.

Sethi, Sanjay; Maloney, Jane; Grove, Lori; Wrona, Catherine; Berenson, Charles S. (2006): Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Am J Respir Crit Care Med* 173 (9), S. 991–998.

Sezer, Hafize; Akkurt, Ibrahim; Guler, Nuran; Marakoglu, Kamile; Berk, Serdar (2006): A case-control study on the effect of exposure to different substances on the development of COPD. In: *Ann Epidemiol* 16 (1), S. 59–62.

Shimbara, A.; Christodoulopoulos, P.; Soussi-Gounni, A.; Olivenstein, R.; Nakamura, Y.; Levitt, R. C. et al. (2000): IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. In: *J Allergy Clin Immunol* 105 (1 Pt 1), S. 108–115.

Shirai, Toshihiro; Suda, Takafumi; Inui, Naoki; Chida, Kingo (2010): Correlation between Peripheral Blood T-cell Profiles and Clinical and Inflammatory Parameters in Stable COPD. In: *Allergol. Int.* 59 (1), S. 75–82.

Smyth, Lucy J. C.; Starkey, Cerys; Vestbo, Jorgen; Singh, Dave (2007): CD4-regulatory cells in COPD patients. In: *Chest* 132 (1), S. 156–163.

Sorheim, Inga-Cecilie; Johannessen, Ane; Gulsvik, Amund; Bakke, Per S.; Silverman, Edwin K.; Demeo, Dawn L. (2010): Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? In: *Thorax* 65 (6), S. 480–485.

Stockinger, Brigitta; Veldhoen, Marc (2007): Differentiation and function of Th17 T cells. In: *Curr Opin Immunol* 19 (3), S. 281–286.

Stockley, Robert A. (2002): Neutrophils and the pathogenesis of COPD. In: *Chest* 121 (5 Suppl), S. 151S-155S.

Stoller, James K.; Aboussouan, Loutfi S. (2005): Alpha1-antitrypsin deficiency. In: *Lancet* 365 (9478), S. 2225–2236.

Svanes, C.; Sunyer, J.; Plana, E.; Dharmage, S.; Heinrich, J.; Jarvis, D. et al. (2009): Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Thorax* 65 (1), S. 14–20.

Tager, I. B.; Ngo, L.; Hanrahan, J. P. (1995): Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. In: *Am J Respir Crit Care Med* 152 (3), S. 977–983.

Takanashi, S.; Hasegawa, Y.; Kanehira, Y.; Yamamoto, K.; Fujimoto, K.; Satoh, K.; Okamura, K. (1999): Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. In: *Eur Respir J* 14 (2), S. 309–314.

Tang, Anita L.; Teijaro, John R.; Njau, Modesta N.; Chandran, Smita S.; Azimzadeh, Agnes; Nadler, Steven G. et al. (2008): CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4⁺ FoxP3⁺ T cell homeostasis. In: *J Immunol* 181 (3), S. 1806–1813.

Tan, Wan C.; Lo, Christine; Jong, Aimee; Xing, Li; Fitzgerald, Mark J.; Vollmer, William M. et al. (2009): Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. In: *CMAJ* 180 (8), S. 814–820.

Tashkin, D. P.; Altose, M. D.; Connett, J. E.; Kanner, R. E.; Lee, W. W.; Wise, R. A. (1996): Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. In: *Am J Respir Crit Care Med* 153 (6 Pt 1), S. 1802–1811.

Taylor, A. E.; Finney-Hayward, T. K.; Quint, J. K.; Thomas, C. M. R.; Tudhope, S. J.; Wedzicha, J. A. et al. (2010): Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. In: *Eur Respir J* 35 (5), S. 1039–1047.

Temann, U. A.; Geba, G. P.; Rankin, J. A.; Flavell, R. A. (1998): Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. In: *J Exp Med* 188 (7), S. 1307–1320.

Temann, Ulla-Angela; Ray, Prabir; Flavell, Richard A. (2002): Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. In: *J Clin Invest* 109 (1), S. 29–39.

Townsend, J. M.; Fallon, G. P.; Matthews, J. D.; Smith, P.; Jolin, E. H.; McKenzie, N. A. (2000): IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. In: *Immunity* 13 (4), S. 573–583.

Trupin, L.; Earnest, G.; San Pedro, M.; Balmes, J. R.; Eisner, M. D.; Yelin, E. et al. (2003): The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Eur Respir J* 22 (3), S. 462–469.

Trzonkowski, Piotr; Szmit, Ewa; Mysliwska, Jolanta; Dobyszek, Anita; Mysliwski, Andrzej (2004): CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. In: *Clin Immunol* 112 (3), S. 258–267.

van der Strate, Barry W. A.; Postma, Dirkje S.; Brandsma, Corry-Anke; Melgert, Barbro N.; Luinge, Marjan A.; Geerlings, Marie et al. (2006): Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? In: *Am J Respir Crit Care Med* 173 (7), S. 751–758.

Vassallo, Robert; Walters, Paula R.; Lamont, Jeffrey; Kottom, Theodore J.; Yi, Eunhee S.; Limper, Andrew H. (2010): Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. In: *Respir Res* 11 (1), S. 45.

Veldhoen, Marc; Uyttenhove, Catherine; van Snick, Jacques; Helmby, Helena; Westendorf, Astrid; Buer, Jan et al. (2008): Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. In: *Nat Immunol* 9 (12), S. 1341–1346.

Vestbo, J.; Prescott, E.; Lange, P. (1996): Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. In: *Am J Respir Crit Care Med* 153 (5), S. 1530–1535.

Vestbo, Jorgen (2014): COPD: definition and phenotypes. In: *Clin Chest Med* 35 (1), S. 1–6.

Vestbo, Jorgen; Anderson, Julie; Brook, Robert D.; Calverley, Peter M. A.; Celli, Bartolome R.; Crim, Courtney et al. (2013): The Study to Understand Mortality and Morbidity in COPD (SUMMIT) study protocol. In: *Eur Respir J* 41 (5), S. 1017–1022.

Wang, Huaying; Ying, Huajuan; Wang, Shi; Gu, Xiao; Weng, Yuesong; Peng, Weidong et al. (2014): Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Clin Respir J*.

Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL (2013): Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. In: *Pulm Pharmacol Ther* (5):588-95.

Weaver, Casey T.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Harrington, Laurie E. (2007): IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25 (1), S. 821–852.

Wood, A. M.; Pablo, P. de; Buckley, C. D.; Ahmad, A.; Stockley, R. A. (2011): Smoke exposure as a determinant of autoantibody titre in alpha(1)-antitrypsin deficiency and COPD. In: *Eur Respir J* 37 (1), S. 32–38.

Yao, Hongwei; Edirisinghe, Indika; Rajendrasozhan, Saravanan; Yang, Se-Ran; Caito, Samuel; Adenuga, David; Rahman, Irfan (2008): Cigarette smoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294 (6), S. L1174-86.

Zhang J, Chu S, Zhong X, Lao Q, He Z, Liang Y (2013) Increased expression of CD4+IL-17+ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers. *Int Immunopharmacol.* 2013 Jan; 15(1):58-66

Zhou, Liang; Chong, Mark M.W; Littman, Dan R. (2009): Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. In: *Immunity* 30 (5), S. 646–655.

Zhu, Jinfang; Paul, William E. (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults. In: *Blood* 112 (5), S. 1557–1569.

6 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BATF	Basic leucine zipper transcription factor
BCA	bicinchoninic acid assay
BMI	Body Mass Index
BrefA	Brefeldin A
BSA	Bovine serum albumin
BSS	balanced salt solution
bzw.	beziehungsweise
C	Compliance
CBA	Cytometric Bead Array
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DANN
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSE	cigarette smoke extract
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Δ CT	Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus
Δ p	Druckdifferenz
Δ v	Volumendifferenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERS	European Respiratory Society
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
F	Filialgeneration
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Forward Scatter
FCS	fetales Kälberserum
FEV	Einsekundenkapazität
FITC	Fluorescein
Foxp-3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm

G	Gauge
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GSTM ₁	Glutathione S-transferase Mu 1
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.m.	intra muskulär
ICS	Intracellular staining
IFN _γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRF4	Interferon regulatory factor 4
kD	keine Daten
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	knock out
L32	housekeeping gene (ribosomal protein L32)
LABA	long-acting beta-2 agonists
LAMA	lang wirksamer muscarinischer Acetylcholin-Rezeptorantagonist
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MM	Mastermix
m	Monat
m ³	Kubikmeter
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
ME	Mercaptoethanol
MFI	Mean fluorescent intensity
min.	Minute
mL	milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleinacid
μl	mikroliter
n	Anzahl
Na	Natrium
NEAA	Nicht essentielle Aminosäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	Druck
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	phosphate buffered saline
PEEP	positive endexpiratorischer Druck
PerCP	Peridinin
PFA	Paraformaldehyd

pg	pikogramm
PMA	Paramethoxy Amphetamin
P _{max}	maximaler Druck
PU.1	Transkriptionsfaktor PU.1
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
R	Resitance
RE	Rauchexposition
reg	regulatorisch
rh	recombinant
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
SOD ₃	Superoxide dismutase 3
spez.	speziell
SSC	Side Scatter
SURS	Systematic Randomized uniform sampling
T-bet	T-box genes encode transcription factors
Tc	cytotoxic T cell
TGF β ₁	Transforming growth factor beta 1
Th	helper T cell
TIMP	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
ÜS	Überstand
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WP	Waschpuffer
z.B.	zum Beispiel

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Faktoren, die Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf einer COPD haben (Gemäß GOLD 2014)
- Abb. 2 Entzündungsprozesse und beteiligte Immunzellen bei COPD. PJ Barnes Nature Reviews Immunology 8, 183-192 (2008)
- Abb. 3 Differenzierung der einzelnen Th Subtypen, Noelle, Nat Rev Immunol 2010
- Abb. 4 Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf naïve Zellen
- Abb. 5 Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf die Entwicklung von Th-Subtypen
- Abb. 6 Protokoll für die *in vitro* Untersuchung vom Einfluss von CSE-Medium auf bereits differenzierte Th-Subtypen
- Abb. 7 Protokoll für das chronische *in vivo* Maus-Rauchmodel zur Untersuchung vom Einfluss von Zigarettenrauch auf die Differenzierung der verschiedenen Th-Subtypen
- Abb. 8 Bestimmung der toxischen Grenzwerte des CSE-Mediums
- Abb. 9 Einfluss des CSE-Mediums auf die Proliferation verschiedener Th Subtypen
- Abb. 10 Proliferationsindex differenzierter Th Subpopulationen nach der Inkubation mit CSE nach 72 h
- Abb. 11 Reinheit von aufgereinigten naïven CD4+ Zellen
- Abb. 12 Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von Th0 Zellen
- Abb. 13 Bestimmung der relativen Genexpression des Th1 Transkriptionsfaktors Tbet
- Abb. 14 Proteinnachweis für den Th1 Transkriptionsfaktor Tbet
- Abb. 15 Bestimmung der relativen Genexpression des Th2 Transkriptionsfaktors GATA-3
- Abb. 16 Proteinnachweis für den Th2 Transkriptionsfaktor GATA-3
- Abb. 17 Bestimmung der relativen Genexpression der Transkriptionsfaktoren ROR γ t und Foxp-3
- Abb. 18 Reinheit von hoch aufgereinigten naïven CD4+ Zellen

- Abb. 19 Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von hoch reinen Th0 Zellen
- Abb. 20 Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker während der Differenzierung von verschiedenen Th Subtypen
- Abb. 21 Bestimmung der relativen Genexpression des Th1 Transkriptionsfaktors Tbet
- Abb. 22 Proteinnachweis für den Th1 Transkriptionsfaktor Tbet
- Abb. 23 Einfluss von CSE-Medium auf die IFN γ Produktion während der Differenzierung von verschiedenen Th Subtypen
- Abb. 24 Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion Th2 spezifischer Zytokine
- Abb. 25 Bestimmung der relativen Genexpression des Th2 Transkriptionsfaktors GATA-3
- Abb. 26 Proteinnachweis für den Th2 Transkriptionsfaktor GATA-3
- Abb. 27 Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine
- Abb. 28 Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion Th17 spezifischer Zytokine und Bestimmung der rel. Genexpression des Th17 Transkriptionsfaktors ROR γ t
- Abb. 29 Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion Treg spezifischer Zytokine
- Abb. 30 Bestimmung der relativen Genexpression des Treg Transkriptionsfaktors Foxp-3
- Abb. 31 Effekt von CSE-Medium auf die Sekretion und relative Genexpression von IL-9 in unterschiedlich polarisierten Th Zellen
- Abb. 32 Kinetik der Intrazellulären IL-9 Produktion während der Differenzierung von Th2 Zellen
- Abb. 33 Einfluss von CSE-Medium auf IL-9 Produktion während der Differenzierung von Th2 Zellen
- Abb. 34 Zeitabhängige Genexpression von IL-9 und IL-13 in Th2 polarisierten Zellen
- Abb. 35 Zeitabhängige Expression Th2 und Th9 assoziierter Transkriptionsfaktoren in Th2 polarisierten Zellen
- Abb. 36 Einfluss des CSE-Mediums auf die Proliferation von Th9 Zellen

- Abb. 37 Bestimmung des Proliferationsstatus von IL-9+ Th9 Zellen
- Abb. 38 Einfluss von CSE-Medium auf die Differenzierung von Th9 Zellen
- Abb. 39 Einfluss von CSE-Medium auf die IL-9 Sekretion von Th9 Zellen
- Abb. 40 Vergleich der zeitabhängigen Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und IL-9 in Th2 und Th9 differenzierten Zellen
- Abb. 41 Vergleich von Th2 und Th9 zeitabhängiger Sekretion verschiedener Zytokine unter Einfluss von CSE-Medium
- Abb. 42 Vergleich der zeitabhängigen Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Th2 und Th9 differenzierten Zellen
- Abb. 43 Einfluss von CSE-Medium auf intrazelluläre Marker verschiedener ausdifferenzierter Th Subtypen
- Abb. 44 Phänotyp nach chronischer Rauchexposition (RE)
- Abb. 45 Leukozyten in der broncho-alveolären Lavage (BAL) nach chronischer RE
- Abb. 46 Einfluss chronischer RE auf die Verteilung der Lymphozyten-Untergruppen
- Abb. 47 Einfluss chronischer RE auf die Frequenz IFN γ – bzw. IL-4 positiver T-Zellen sekretierter Zytokine
- Abb. 48 Einfluss chronischer RE auf die Transkriptionsfaktoren von Treg, Th17 und IL-9 polarisierten Zellen

Anhang:

- Abb. S1 Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th0 Zellen
- Abb. S2 Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th1 Zellen
- Abb. S3 Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th2 Zellen
- Abb. S4 Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th17 Zellen
- Abb. S5 Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Tregs
- Abb. S6 Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion verschiedener Zytokine durch stimulierte CD4 Zellen
- Abb. S7 Einfluss von CSE-Medium auf die IL-9 Produktion und Bestimmung der relativen Genexpression von IL-9 in Th0 Zellen
- Abb. S8 Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IFN γ + Zellen
- Abb. S9 Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IL-4+ Zellen
- Abb. S10 Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IL-17+ Zellen
- Abb. S11 Nachweis der Spezifität der Differenzierung von Foxp-3+ Zellen
- Abb. S12 Zytokinmuster von Zellen nach Differenzierung zu Th9

Tabellen:

- Tab. 1 Einstufung des Schweregrades der COPD (gemäß GOLD 2014)
- Tab. 2 Versuchstiere
- Tab. 3 Chemikalien
- Tab. 4 FACS-Reagenzien
- Tab. 5 ELISA-Reagenzien
- Tab. 6 Kits
- Tab. 7 Primer
- Tab. 8 Verbrauchsmaterialien
- Tab. 9 Geräte
- Tab. 10 Software

8 Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine weit verbreitete chronisch-entzündliche Erkrankung der Lunge, die mit weltweit steigenden Mortalitätsraten assoziiert ist. Die häufigste Ursache der COPD ist chronische Rauchexposition. Die pathogenen Mechanismen, die zur Ausprägung der Erkrankung führen, sind bisher noch weitgehend unklar. Allerdings wird aktuell diskutiert, dass autoimmune Prozesse, wahrscheinlich gerichtet gegen degradierte Komponenten der extrazellulären Matrix und dabei Th1/Th17 Zellen an der Induktion und/oder Perpetuierung der Erkrankung beteiligt sind.

Vor diesem Hintergrund verfolgen wir die Hypothese, dass Zigarettenrauch einen direkten modifizierenden Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen hat.

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Einfluss von Zigarettenrauch-konditioniertem Medium (CSE) auf die Entwicklung von naïven und differenzierten T-Zellen *in vitro* untersucht. Diese Ergebnisse wurden anhand eines murinen chronischen Rauchexpositionsmodells *in vivo* evaluiert. Die Aktivität verschiedener Th Subtypen wurde mithilfe von mRNA Expressionsanalysen, intrazellulären FACS Messungen, Sekretionsassay und *cytokine cytometric bead assay* bestimmt. *In vitro* verzögert CSE die Proliferation von Th1 Zellen, unterstützt aber gleichzeitig deren Differenzierung nachgewiesen durch eine signifikant höhere IFN γ + Produktion. Gleichzeitig inhibiert CSE die Differenzierung von Tregs deutlich. Die Gabe von CSE auf bereits differenzierte Th Subtypen zeigte, dass im Gegensatz zu Th1 Zellen bereits differenzierte Th17 Zellen stabilisiert bzw. unterstützt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CSE während der Th2 Polarisation zu einem Wechsel zu einem IL-9 produzierenden Phänotyp führt und die IL-9 Produktion in Th9 Zellen signifikant induziert bzw. verstärkt. Diese *in vitro* Ergebnisse konnten *in vivo* verifiziert werden. Die chronische Exposition von Zigarettenrauch führte systemisch zu einer signifikant reduzierten relativen Zellzahl von Tregs und lokal (Lunge) zu einer signifikant gesteigerten relativen Zellzahl von IL-17+ und IL-9+ CD4+-Zellen.

Mit diesen Ergebnissen kann erstmalig gezeigt werden, dass Zigarettenrauch-Komponenten einen direkten Einfluss auf die Differenzierung und Aktivierung von verschiedenen Th Subtypen hat. Dabei wird ein potentiell autoimmun-assoziiierter inflammatorischer Phänotyp mit verstärkter Th1 Aktivität, stabilen Th17 Zellen, weniger Tregs und einer gesteigerten IL-9 Produktion generiert. Somit führt Zigarettenrauch-Exposition zu Änderungen des lokalen Zytokin-Milieus, welches eine chronische Inflammation und autoimmune Prozesse unterstützen und so einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese in der COPD haben kann.

Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a highly prevalent inflammatory disease of the lung associated with increasing mortality rates throughout the world. Tobacco smoke exposure has been identified as most common cause of COPD, however, the pathogenetic mechanisms leading to disease development are still poorly understood. Most recently, autoimmune mechanisms probably directed against degraded components of the extracellular matrix and a role of Th1/Th17 have been proposed to be involved in induction and/or perpetuation of the inflammatory processes.

Based on these observations we hypothesized that cigarette smoke directly impacts on the differentiation of Th cells.

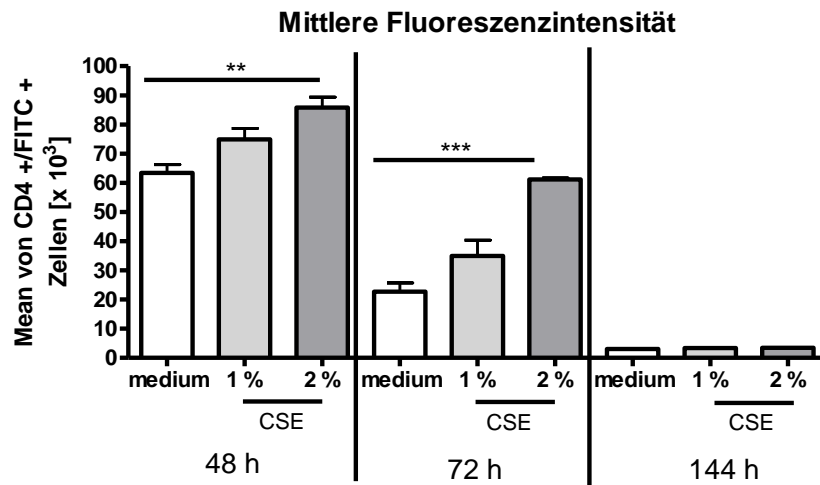
To test this hypothesis, we analyzed the influence of cigarette smoke extract-conditioned medium (CSE) on the development of naïve and differentiating T cells *in vitro* and proofed these findings in a murine chronic smoke exposure model *in vivo*. The activation state of Th subsets was determined by intracellular FACS staining, cytokine secretion assays and cytometric bead assays. *In vitro* CSE delays the proliferation but promotes the differentiation of Th1 cells. The number of IFN γ + Th1 cells was decreased after 3 days of polarisation with CSE, however, remaining Th1 cells were more active and produced significantly more IFN γ . In parallel, CSE directly inhibited the development of Tregs. Application of CSE in a late stage of differentiation preferentially stabilized/promoted an already established Th17 phenotype in contrast to a Th1 phenotype. In addition, it could be shown that CSE drives Th2 cells into an IL-9 producing phenotype

and significantly increases the production of IL-9 in Th9 cells. These *in vitro* findings could be verified in the *in vivo* mouse model. Chronic cigarette smoke exposure resulted systemically in significant less numbers of Tregs and locally to significant more IL-9+ and IL-17+ CD4+ cells.

These data demonstrate for the first time that cigarette smoke directly influences differentiation and activity of different Th subtypes and drives them into a potentially more autoimmune associated inflammatory subtype with enhanced Th1 activity, stable Th17 cells, less Tregs and increased IL-9 production.

9 Anhang

A



B

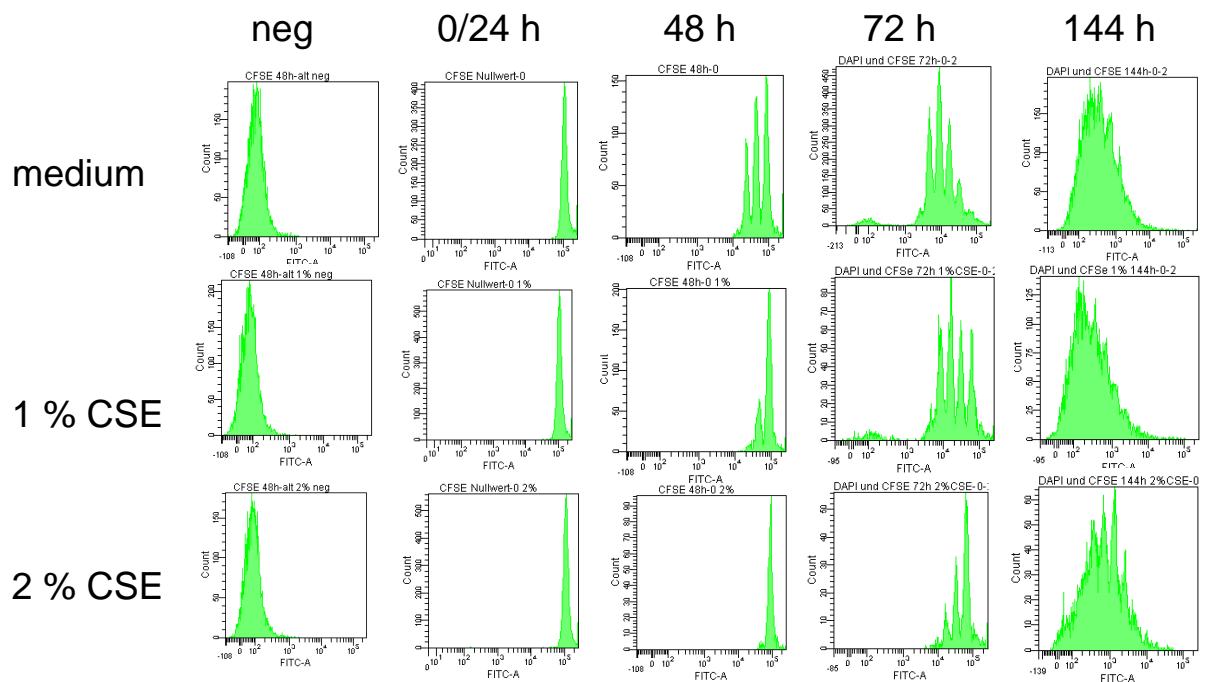
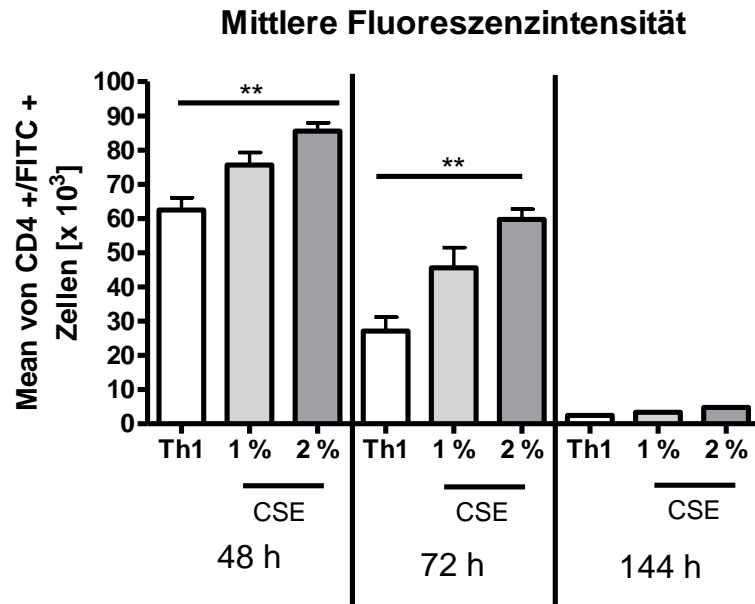


Abb. S1: Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th0 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 + IL-2 (Th0) \pm CSE kultiviert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen und (B) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; **p<0,01 und ***p<0,001

A



B

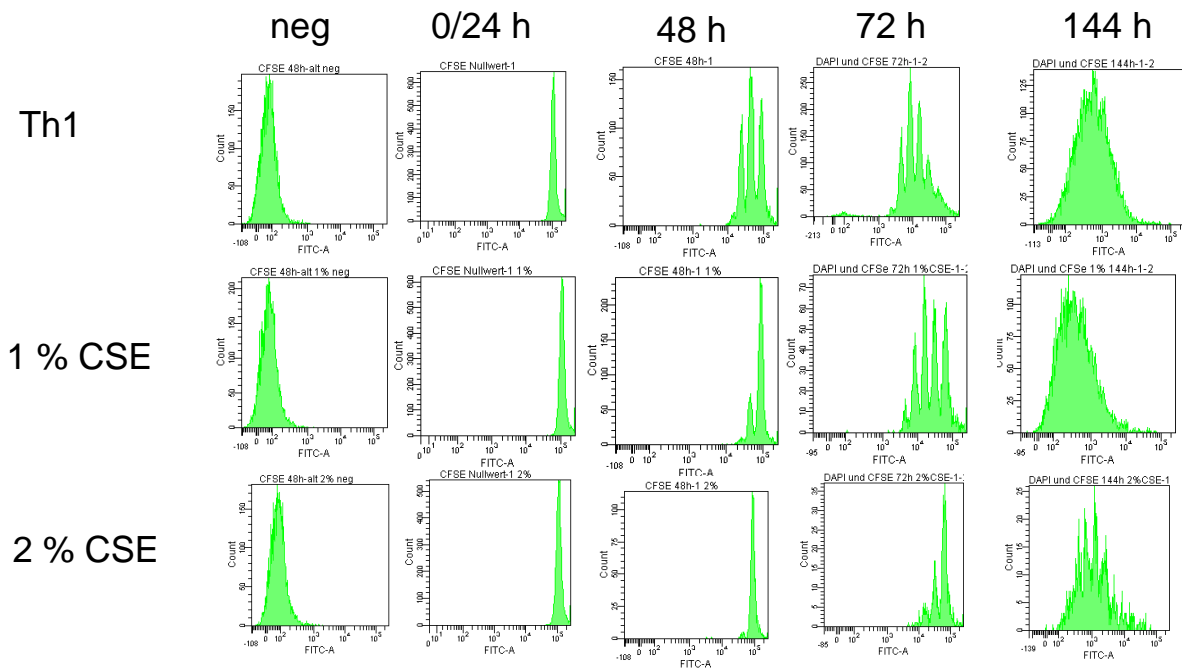
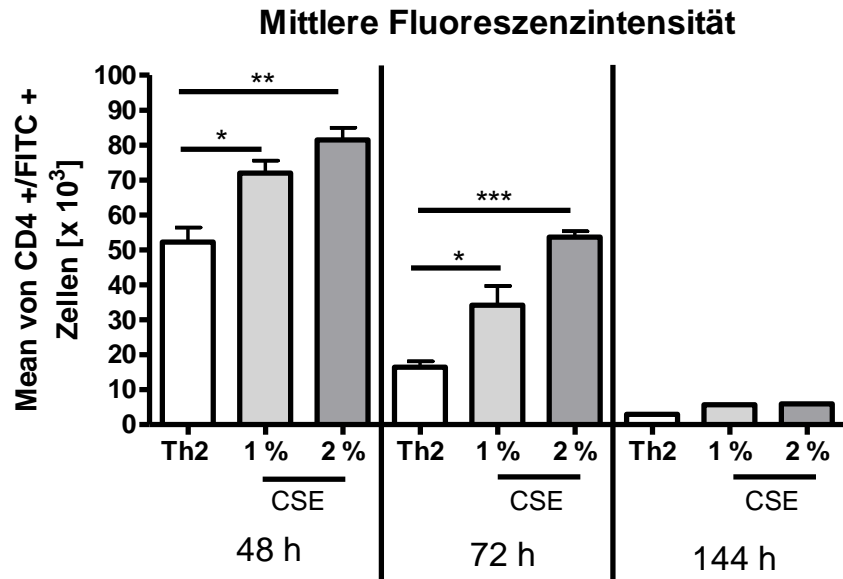


Abb. S2: Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th1 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Th1 Zytokin-Mix \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen und (B) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; **p<0,01

A



B

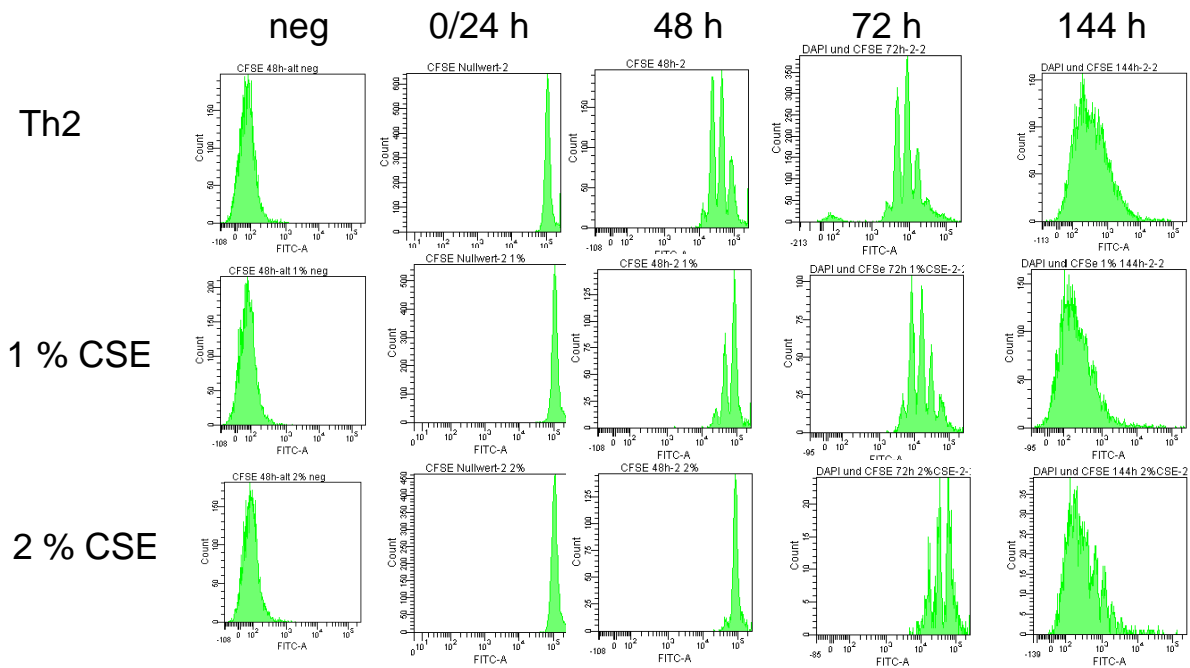
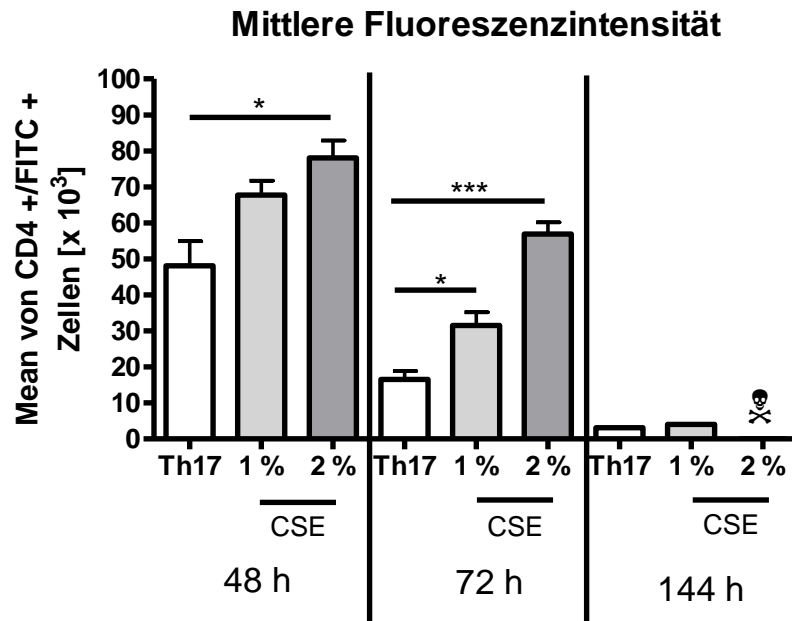


Abb. S3: Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th2 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Th2 Zytokin-Mix \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen und (B) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

A



B

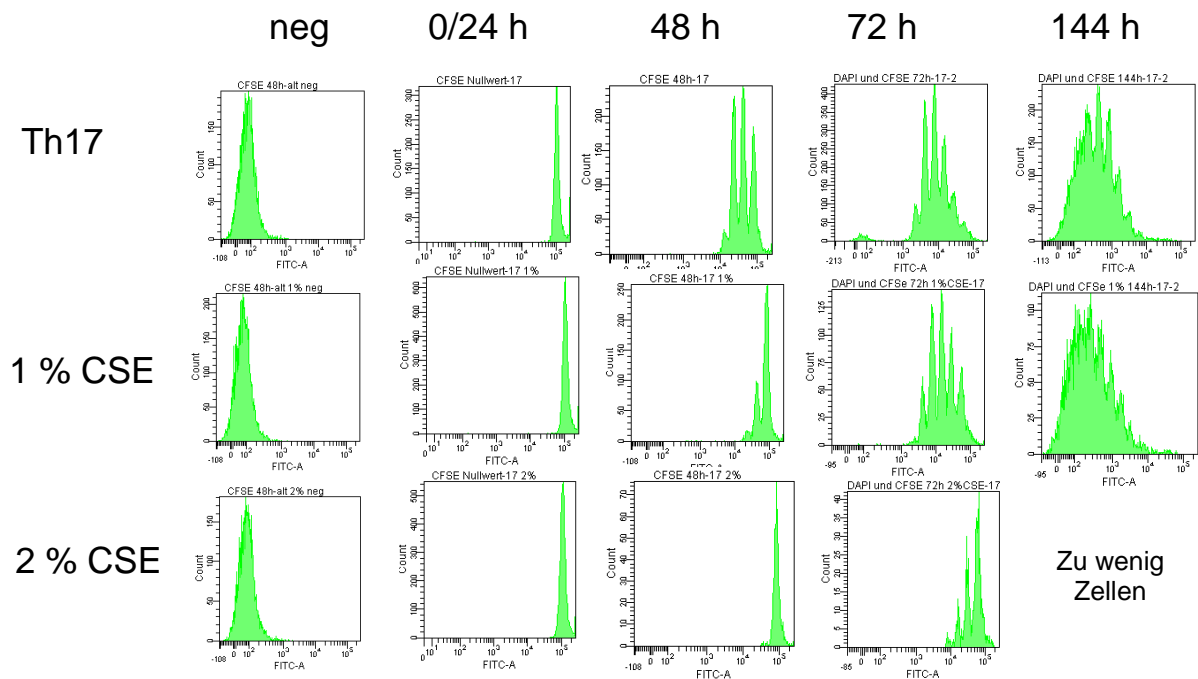
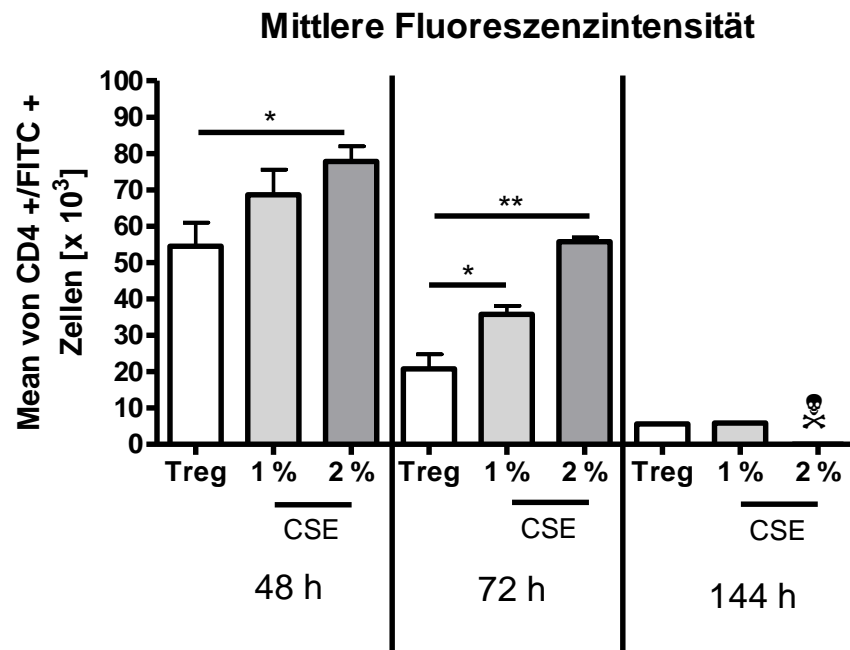


Abb. S4: Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Th17 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Th17 Zytokin-Mix \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen und (B) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; *p<0,05 und ***p<0,001

A



B

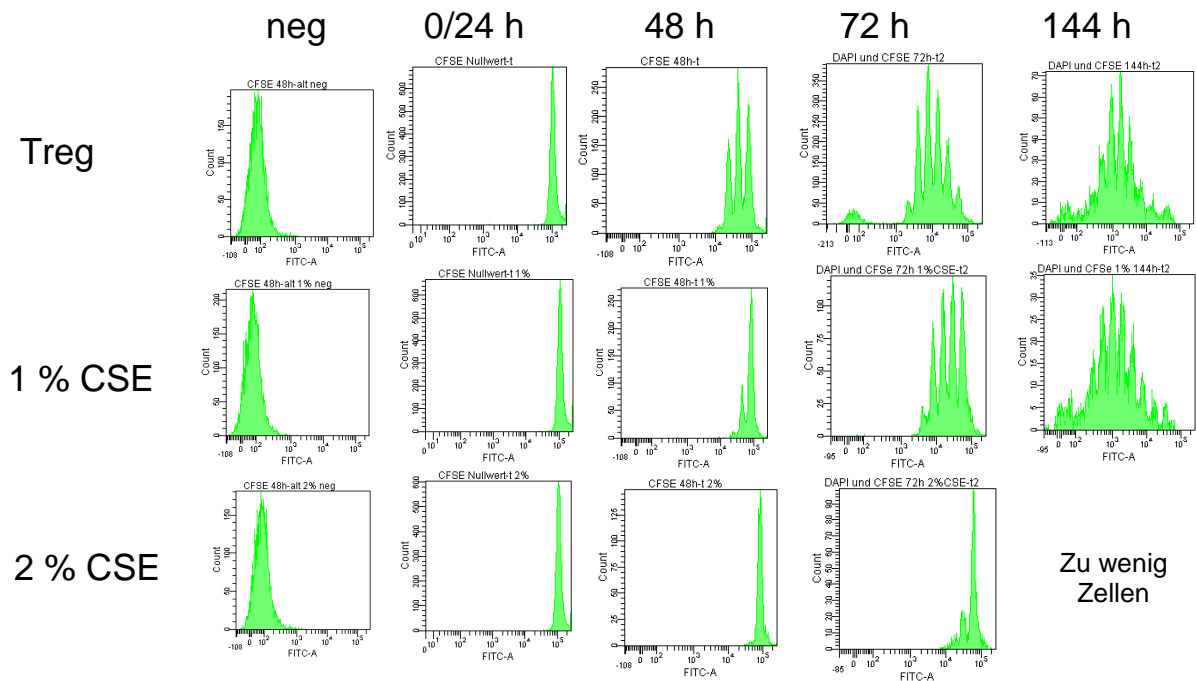


Abb. S5: Einfluss des CSE-Mediums auf die Kinetik der Proliferation von Tregs

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit α CD3/ α CD28 und dem Treg Zytokin-Mix \pm CSE polarisiert. Gezeigt sind von lebenden Zellen (DAPI negativ) (A) die mittlere Fluoreszenzintensität von CFSE; Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen und (B) repräsentative Histogramme n=3 Versuchsansätze; *p<0,05 und **p<0,01

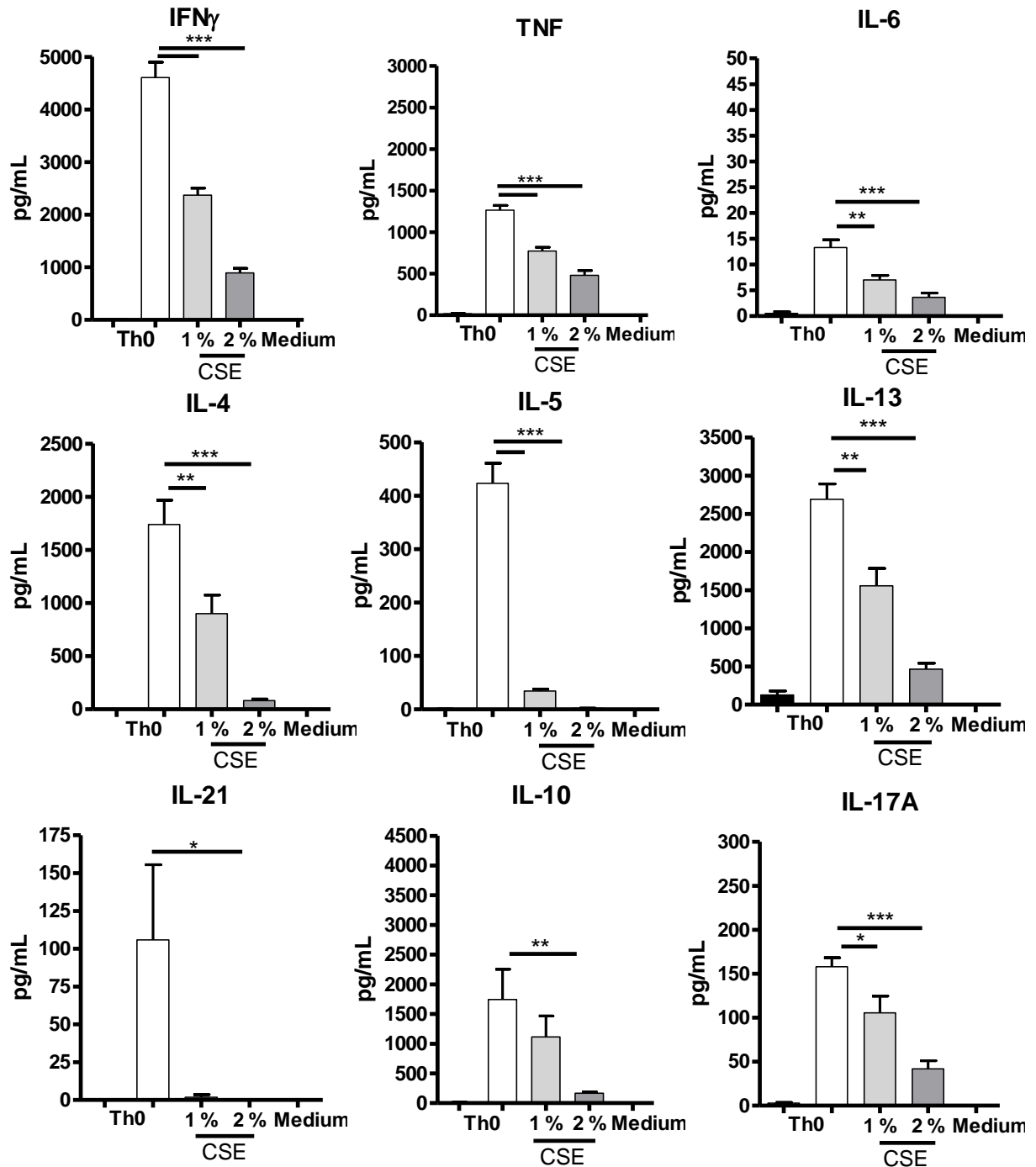


Abb. S6: Einfluss von CSE-Medium auf die Produktion verschiedener Zytokine durch stimulierte CD4 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL2 \pm CSE für 3 Tage kultiviert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001

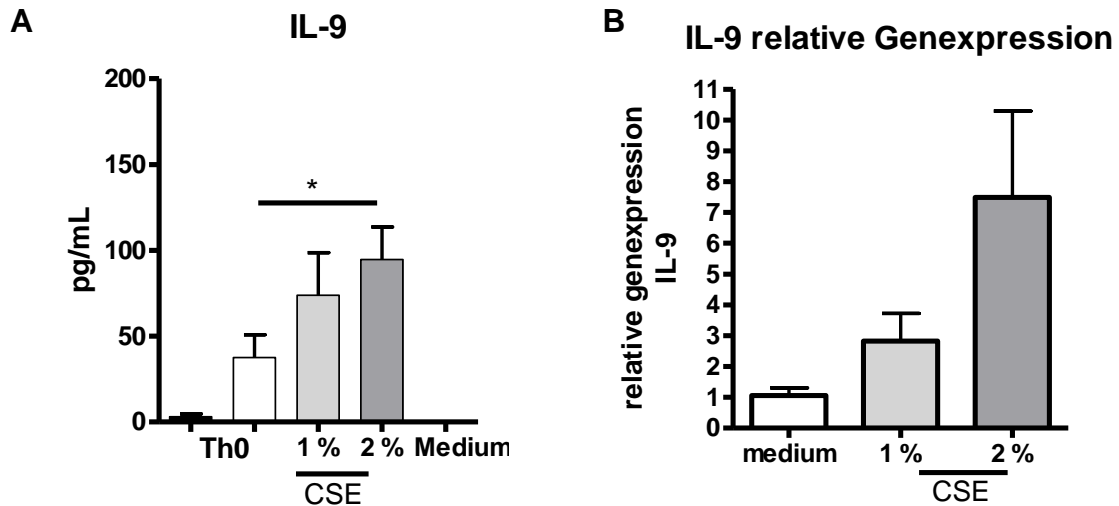


Abb. S7: Einfluss von CSE-Medium auf die IL-9 Produktion und Bestimmung der relativen Genexpression von IL-9 in Th0 Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th0 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 + IL-2 \pm CSE für 3 Tage stimuliert und dann 500.000 Zellen für weitere 24 h mit α CD3 restimuliert. (A) Der Überstand wurde mittels CBA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Versuchsansätzen in Triplikaten, *p<0,05. Aus den Zellen wurde mittels qPCR die relative Genexpression von IL-9 bestimmt. Gezeigt sind (B) Mittelwerte \pm SEM von $2^{-\Delta\Delta CT}$ bezogen auf die Kontrollgruppe ohne CSE, ΔCT normalisiert auf das *housekeeping* Gen L32, n=2 Versuchsansätze in Triplikaten *p<0,05

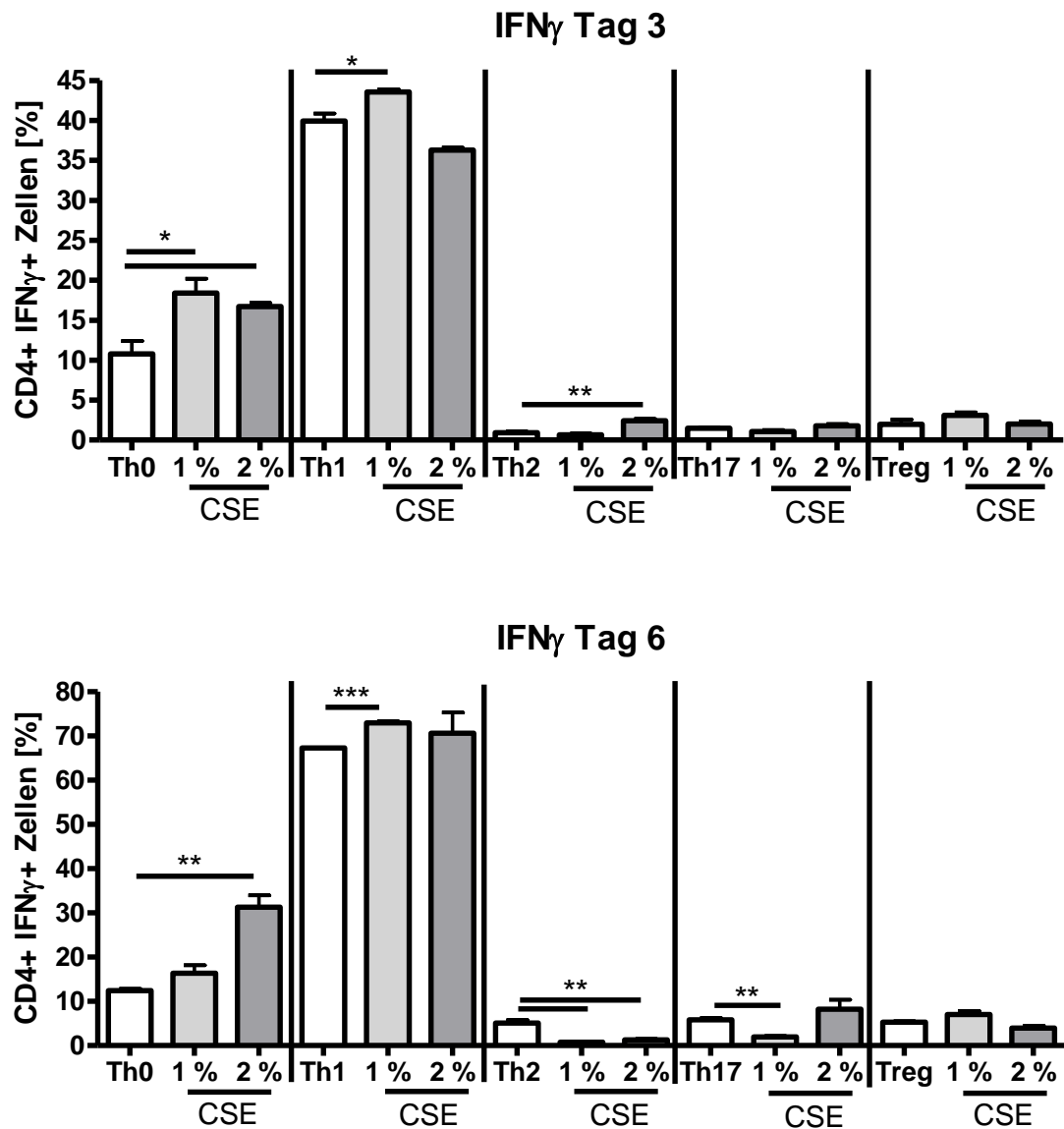


Abb. S8: Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IFN γ + Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spez. Zytokin-Mix für Th0/ Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse des intrazellulären Markers erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär mit IFN γ (PE) und CD4 (APC) gefärbt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

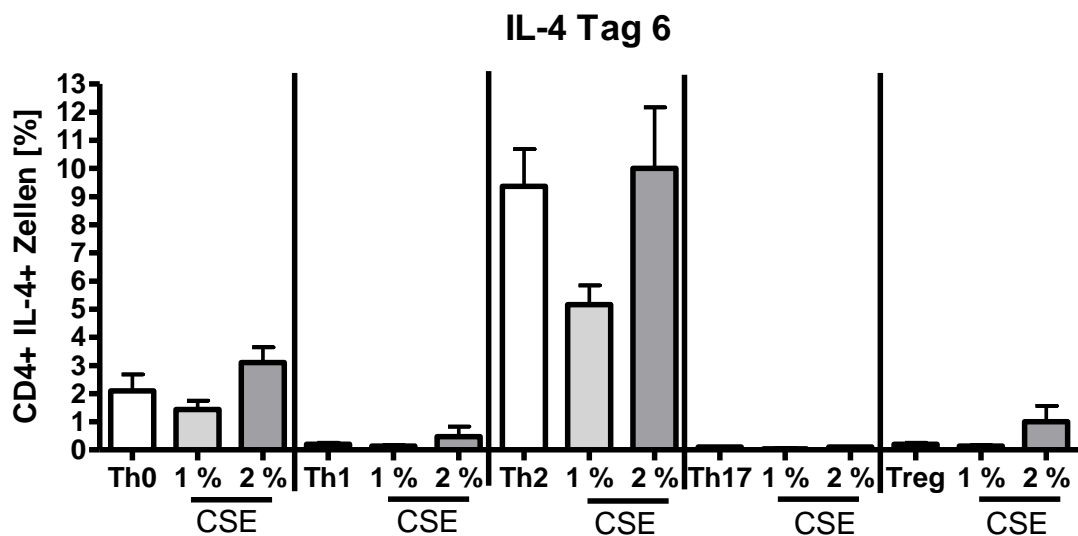
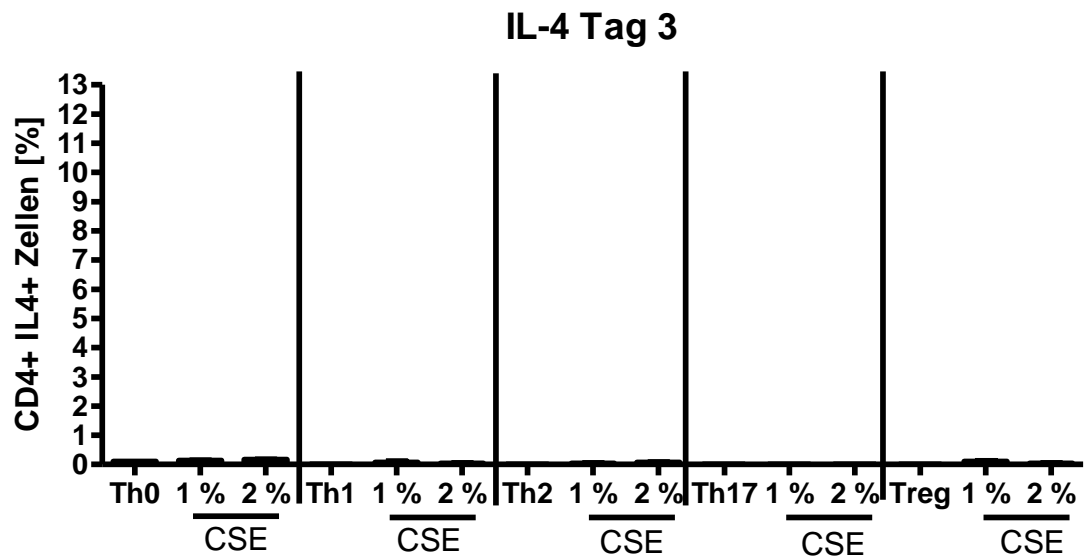


Abb. S9: Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IL-4+ Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spez. Zytokin-Mix für Th0/ Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse des intrazellulären Markers erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär mit IL-4 (PE) und CD4 (APC) gefärbt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen.

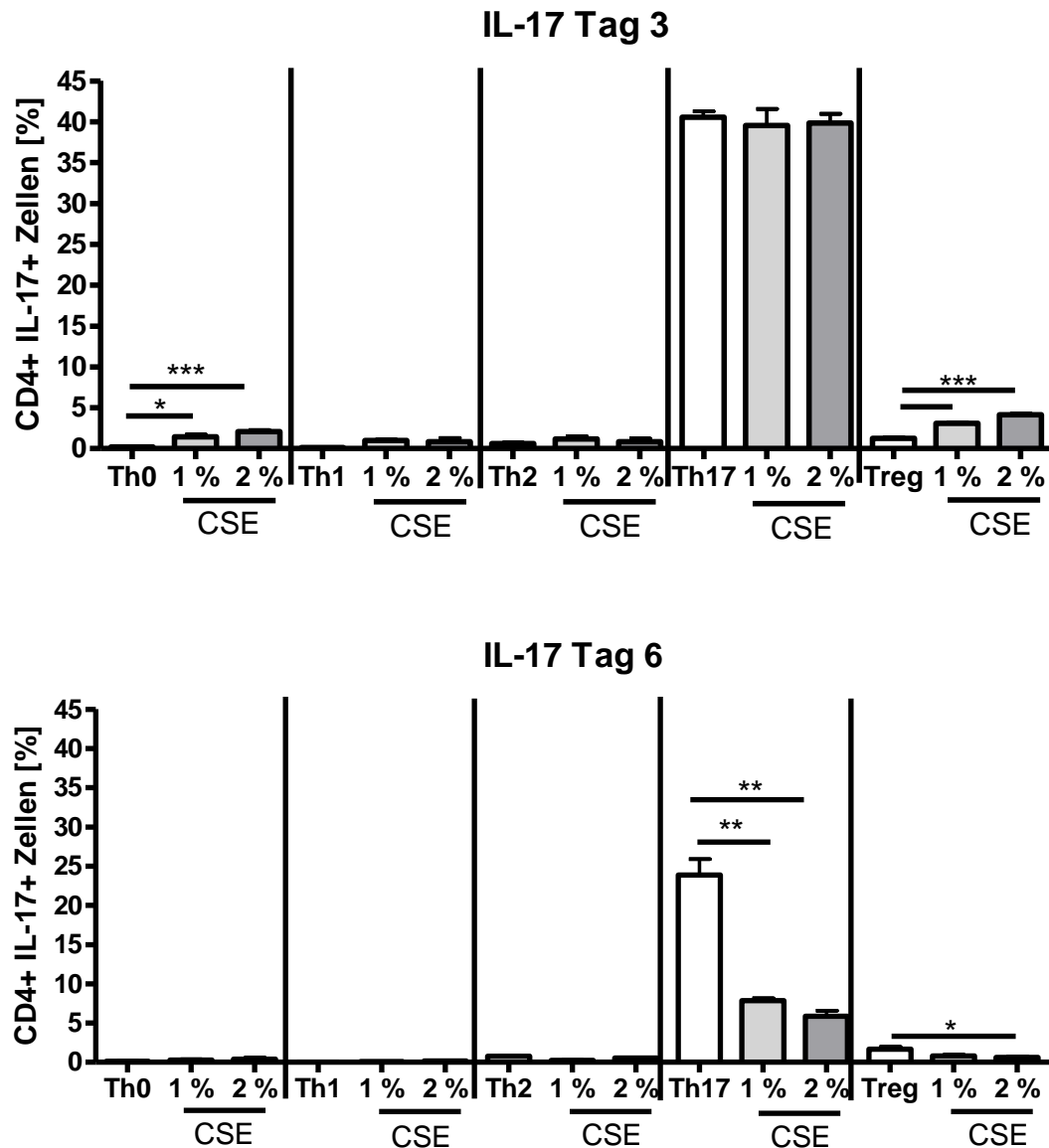


Abb. S10: Nachweis der Spezifität der Differenzierung von IL-17+ Zellen

Aufgereinigte naive CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spez. Zytokin-Mix für Th0/ Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse des intrazellulären Markers erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär mit IL-17 (PE) und CD4 (APC) gefärbt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

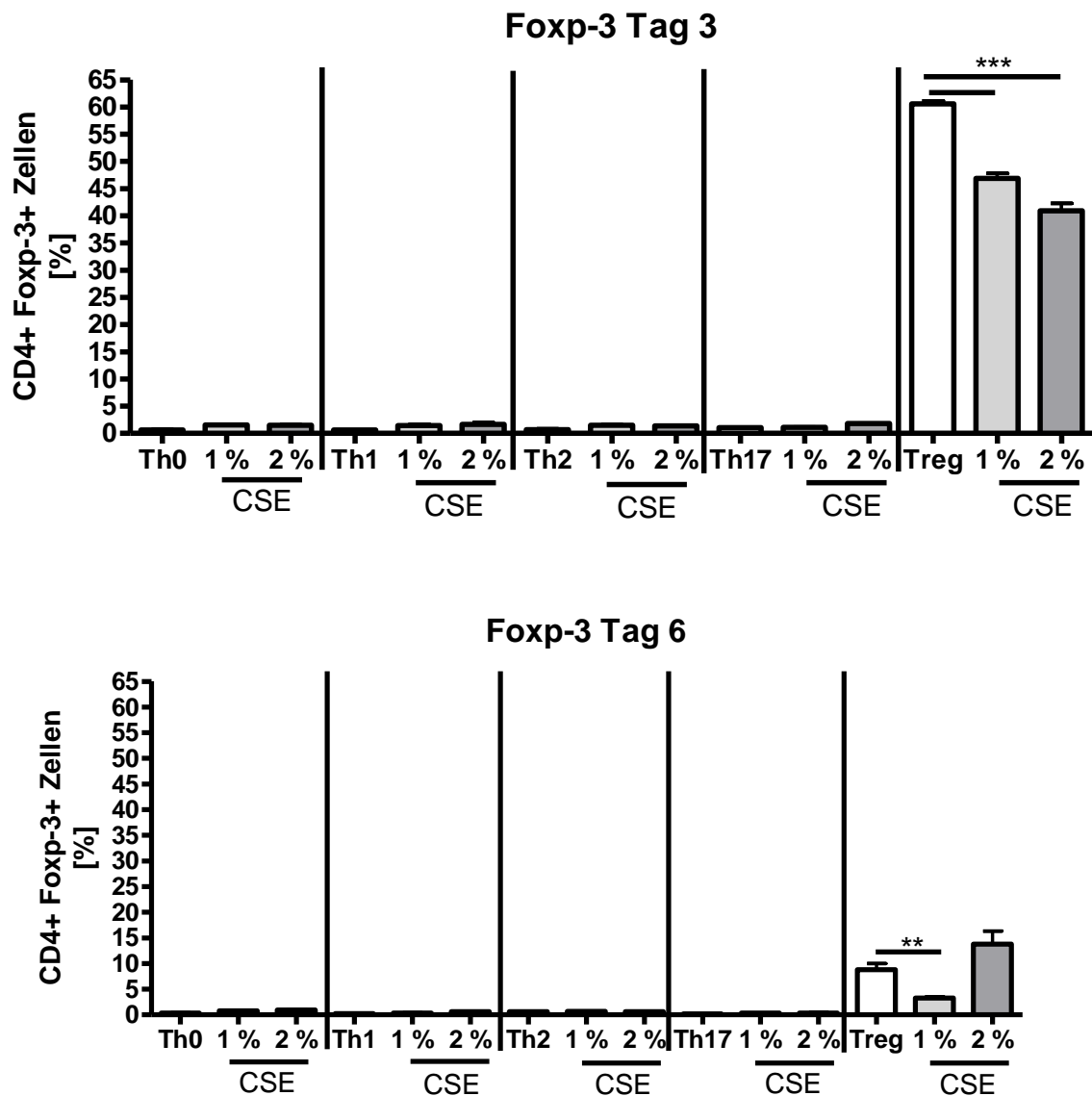


Abb. S11: Nachweis der Spezifität der Differenzierung von Foxp-3+ Zellen

Aufgereinigte naïve CD4+ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter verschiedenen Th Subtyp Bedingungen (spez. Zytokin-Mix für Th0/ Th1/ Th2/ Th17 und Treg) mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen für die klonale Expansion gesplittet und wieder mit frischem Medium \pm CSE + IL-2 aufgefüllt. Die Analyse des intrazellulären Markers erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 6 indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär mit Foxp-3 (PE) gefärbt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen, **p<0,01 und ***p<0,001.

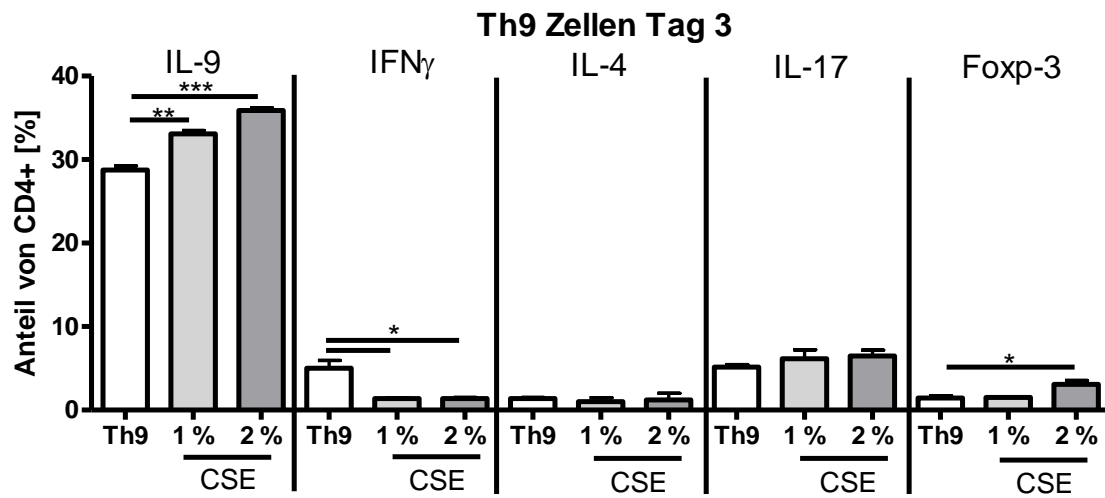


Abb. S12: Zytokinmuster von Zellen nach Differenzierung zu Th9

Aufgereinigte naive CD4⁺ Zellen aus der Milz von C57Bl/6 Mäusen wurden unter Th9 Bedingungen mit α CD3/ α CD28 \pm CSE für 3 Tage stimuliert. Die Analyse der intrazellulären Marker erfolgte an Tag 3, indem die Zellen 4 h mit BrefA/Ionomycin und PMA restimuliert wurden und nach Fixierung mit 2 % PFA für die FACS Messungen intrazellulär gefärbt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Versuchsansätzen, *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001.

10 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Turowska A, Librizzi D, **Baumgartl N**, Kuhlmann J, Dicke T, Merkel O, Homburg U, Höffken H, Renz H, Garn H. Biodistribution of the GATA-3-specific DNase hgd40 after inhalative exposure in mice, rats and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Oct 15;272(2):365-72.

Nicht veröffentlichte Abstracts / Kongressbeiträge:

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn
Experimental Induction of an anti-elastin autoimmune response leads to a COPD-like inflammatory phenotype in lungs of mice
ATS 2014 International Conference in San Diego, Californien

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn
Effects of cigarette smoke extract-conditioned medium on T helper cell development and differentiation in vitro,
von-Behring-Röntgen-Symposium 2014, Marburg

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn
The role of Th1 cells and their transcription factor Tbet in COPD
SFB-Meeting, Angerer Alm 2013

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Holger Garn
Influence of cigarette-smoke extract conditioned medium on CD4+ T cell differentiation *in vitro*
Herbsttagung 2013, Marburg

A Turowska, T Dicke, **N Baumgartl**, J Kuhlmann, H Renz, H Garn
Efficacy of the human GATA-3-specific DNase hgd40 in a house dust mite model of allergic airway inflammation in mice
ATS 2013 International Conference: American Thoracic Society, Texas

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn
Autoimmune induction of a COPD-like inflammatory phenotype in mice ERS
2013, Barcelona

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn T-
cell-mediated mechanisms in combined models of autoimmune and
inflammation-induced COPD UGMLC Meeting 2013, Gießen

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Holger Garn The role of Th1
lymphocytes and the transcription factor Tbet in the development of COPD in an
animal model SFB-Meeting, Angerer Alm 2012

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn The
role of Th1 cells and their transcription factor Tbet in COPD 4th autumn school,
Bad Schandau 2012

A Turowska , T Dicke , **N Baumgartl** , J Kuhlmann , H Renz , H Garn
Distribution and efficacy of a GATA-3-specific DNase in experimental allergic
asthma models UGMLC/DZL, 2012 Marburg

Nadja Baumgartl, Agnieszka Turowska, Norbert Weißmann, Holger Garn
Autoimmune induction of a COPD-like inflammatory phenotype in mice
UGMLC/DZL, 2012 Marburg

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Bauer, Braun, Daut, del Ray, Elsässer, Frenking, Garn, Garten, Grzeschik, Gudermann,Hasilik, Heeg, Heimbrod, Jungclas, Kirchner, Klenk, Koolmann, Kunz, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Maisner, Mandrek, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Radsack, Renz, Röhm, Schäfer, Seitz, Weihe,Westermann, Yu

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz und PD Dr. Holger Garn angefertigt, bei denen ich mich für die Möglichkeit meine Dissertation in dem Institut durchführen zu können, bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern PD Dr. Holger Garn und Dr. Agnieszka Turowska für die außerordentlich intensive und geduldige wissenschaftliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Durchsicht des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Michael Seimetz, Prof. Dr. Norbert Weissmann, Dr. Ali Önder Yildirim, Dr. Magdalene Huber für wissenschaftliche Anregungen und die gute Kooperationsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt unseren technischen Mitarbeitern für die praktische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft. Dank an: Sophia Bernhardt, Alexandra Fischer, Bärbel Camara, Thomas Ruppertsberg, Nicole Disser, Wilma Hastedt, Marcel Schimmel und unseren Azubis Kevin und Lena.

Ebenso einen herzlichen Dank an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe.

Bei Dr. Katrin Fröbuis möchte ich mich für die Durchführung der Western Blots bedanken.

Außerdem richte ich einen besonderen Dank an die Mitarbeiter von Sterna biologicals für die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen: Dipl. Ursula Homburg, Dr. Agnieszka Turowska, Dr. Anke Müller, Dipl. Jens Kuhlmann, Dr. Joachim Bille, Dr. Ulrich Purath und alle anderen Mitarbeiter von sterna biologicals.

Vielen Dank allen, die an der Durchsicht des Manuskriptes beteiligt waren: Dr. Holger Garn, Dr. Karen Bayer, Dr. Anke Müller, Dipl. Hum.-Biol. Christina Hollmann, Monika Jerchel und Andreas Trommer.

Meinem damaligen Freund Andreas Trommer und meiner Freundin Monika Jerchel danke ich für die moralische Unterstützung, die während der Arbeit einige Male nötig war.

Zum Schluss ein ganz herzlicher Dank meinen Eltern Brigitte und Norbert Baumgartl, die immer an mich geglaubt haben. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

DANKE